

还原态吡咯喹啉醌清除氮自由基能力研究

The research on scavenging nitrogen radical ability of reduced pyrroloquinoline quinone

马 科 吴贞贞 杨雪鹏

MA Ke WU Zhen-zhen YANG Xue-peng

(郑州轻工业大学食品与生物工程学院, 河南 郑州 450008)

(College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of

Light Industry, Zhengzhou, Henan 450008, China)

摘要:探讨了不同质量浓度及不同反应时间条件下还原态吡咯喹啉醌(Reduced pyrroloquinoline quinone, PQQH₂)对 ABTS 自由基清除率的变化规律,建立一级和二级反应动力学模型,并以常规抗氧化剂维生素 C 作为对照,研究了 PQQH₂ 对 ABTS 自由基的清除性能。结果表明:PQQH₂ 浓度越高,时间越长,对 ABTS 自由基清除率越高,反应 25 min, 70 mg/L PQQH₂ 对自由基清除率可达到 90% 以上。准二级动力学模型拟合的线性相关系数为 0.959~0.996,更符合 PQQH₂ 对 ABTS 自由基的清除特性。PQQH₂ 清除 ABTS 自由基的 IC₅₀ 值为 90 μmol/L,是维生素 C 的 51.14%,当保温时间一定时,相同质量浓度的维生素 C 对 ABTS 自由基清除能力的损失是 PQQH₂ 的 2~3 倍;当加热温度一定时,相同质量浓度的维生素 C 对 ABTS 自由基的清除能力损失约为 PQQH₂ 的 3~7 倍。综上,PQQH₂ 的抗氧化能力优于维生素 C。

关键词:还原态吡咯喹啉醌;抗氧化;ABTS 自由基;反应动力学;热稳定性

Abstract: The changes were discussed in the scavenging rate of ABTS free radicals of reduced pyrroloquinoline quinone (PQQH₂) under different mass concentrations and different reaction time conditions. The primary and secondary reaction kinetic models were established. With conventional antioxidant vitamin C as a control, the scavenging performance of PQQH₂ on ABTS free radicals was studied. Results: The higher of the concentration of PQQH₂ and the longer the time were, the higher of the scavenging rate of ABTS free radicals was. After 25

minutes of reaction, the scavenging rate of 70 mg/L PQQH₂ could reach more than 90%. The linear correlation coefficient fitted by the quasi-second-order kinetic model was 0.959~0.996, which was more in line with the scavenging characteristics of ABTS free radicals by PQQH₂. The IC₅₀ value of PQQH₂ for scavenging ABTS free radicals was 90 μmol/L, which was 51.14% of vitamin C, when the holding time was constant, the loss of ABTS free radical scavenging ability of the same concentration of vitamin C was 2 to 3 times that of PQQH₂. At a certain temperature, the loss of ABTS free radical scavenging ability of the same concentration of vitamin C was about 3 to 7 times that of PQQH₂. In summary, PQQH₂ has better antioxidant capacity than vitamin C.

Keywords: reduced pyrroloquinoline quinone (PQQH₂); antioxidant; ABTS free radical; reaction kinetics; thermal stability

吡咯喹啉醌(Pyrroloquinoline quinone, PQQ),是一种含有 3 个羧基的水溶性醌类化合物,是继核黄素和烟酰胺后的第三类辅酶^[1],广泛存在于母乳、植物、动物组织、某些单细胞真核生物和许多细菌中^[2]。作为许多重要酶的辅基,PQQ 对生物体具有多种生物功能,如调控基因表达和蛋白质功能^[3]、神经保护作用^[4]、调节机体自由基水平^[5]和信号转导、修复 DNA 功能^[6]等。

在自然界中,吡咯喹啉醌存在醌型(PQQ,氧化态)、半醌型(PQQH)和氢醌型(PQQH₂,还原态)3 种可以互相转化的稳定状态(见图 1)^[7-8]。氧化态 PQQ 呈醌形式,PQQH₂ 呈邻二酚形式。PQQ 可以通过从底物转移两个质子和两个电子转化为 PQQH₂^[9]。作为氧化还原酶的辅基,PQQ 3 种状态的转化在底物的氧化还原反应中起到电子传递作用。

已有研究^[10]表明,PQQH₂ 具有良好的抗氧化性,可以有效清除机体活性氧自由基。但是,PQQ 对于活性氮

基金项目:国家自然科学基金(编号:U1904101,32000281)

作者简介:马科,男,郑州轻工业大学讲师,博士。

通信作者:杨雪鹏(1973—),男,郑州轻工业大学教授,博士。

E-mail: yangxuepeng@zzuli.edu.cn

收稿日期:2020-11-23

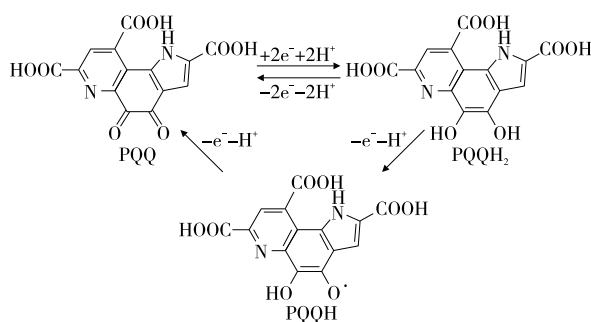


图 1 PQQ 氧化态与还原态转化及电子传递功能

Figure 1 PQQ oxidation state and reduction state transformation and electron transfer function

(如:ABTS)自由基的清除作用,未见文献报道。活性氮自由基是机体内氧化应激过程的产物,在机体过多地积累会导致慢性炎症,进而引发很多疾病,例如癌症、糖尿病、动脉粥样硬化等^[11-12]。试验拟以 ABTS 自由基的清除能力为指标对 PQQH₂ 的抗氧化性进行研究,以期为其作为抗氧化剂在食品中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

PQQH₂ 标品:色谱纯,阿拉丁试剂公司;
维生素 C 标品:色谱纯,郑州派尼化学试剂公司;
ABTS:分析纯,麦克林生物科技有限公司;
其余试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器设备

分析天平:AB256-S 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

精密 pH 计:PHS-3D 型,上海雷磁仪器厂;

紫外—分光光度计:2300 型,尤尼克(上海)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 清除 ABTS 自由基的反应动力曲线测定 分别配制 PQQH₂ 标准溶液 10, 30, 50, 70 mg/L。将 PQQH₂ 溶液与 0.1 mmol/L 的 ABTS 工作液进行自由基反应,间隔一定时间,测定吸光度,研究 PQQH₂ 清除 ABTS 自由基的速度与时间变化的关系,试验重复 3 次,以时间为横坐标,清除率为纵坐标绘制反应动力曲线图,按式(1)计算 ABTS 自由基清除率。

$$a = \frac{A_0 - A_1}{A_1} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

a ——ABTS 自由基清除率, %;

A_0 ——空白对照组的吸光度;

A_1 ——1 mL PQQH₂ 和 ABTS 工作液的吸光度。

根据文献^[13],建立反应动力学模型:

(1) 准一级反应动力学方程:

$$\ln \frac{C_t}{C_0} = -k_1 t, \quad (2)$$

式中:

C_t ——ABTS 自由基在 t 时刻的质量浓度, mg/mL;

C_0 ——ABTS 自由基在 $t = 0$ 时的质量浓度, mg/mL;

k_1 ——一级反应速率常数, mg/(mL · min)。

ABTS 自由基剩余率:

$$w = \frac{C_t}{C_0} \times 100\% = 1 - a, \quad (3)$$

式中:

w ——ABTS 自由基的剩余率, %。

结合式(2)和式(3)得准一级反应动力学方程式:

$$\ln(1 - a) = -k_1 t, \quad (4)$$

(2) 准二级反应动力学方程:

$$\frac{1}{C_t} = k_2 t + \frac{1}{C_0}, \quad (5)$$

结合式(3)和式(5)得准二级反应动力学方程式:

$$\frac{1}{1 - a} = k_2 C_0 t + 1, \quad (6)$$

式中:

a ——ABTS 自由基清除率, %;

k_2 ——二级反应速率常数, mg/(mL · min)。

1.2.2 清除 ABTS 自由基能力半数清除率(IC₅₀)的测定

以维生素 C 为阳性对照,计算 ABTS 自由基清除率达到 50% 时样品的质量浓度。分别配制 PQQH₂ 标准溶液 10, 30, 50, 70, 90 mg/L。将 1 mL PQQH₂ 溶液与 3 mL 0.1 mmol/L 的 ABTS 自由基反应,试验重复 3 次。半数清除率浓度的计算,运用 Origin 9.1 进行。

1.2.3 热稳定性研究

(1) 加热温度对 PQQH₂ 稳定性的影响:配制 30, 50, 70 mg/L PQQH₂ 标准溶液,分别在相同时间(4 h)、不同温度(30, 50, 75, 100 °C)水浴下反应,测定 PQQH₂ 对 ABTS 自由基的清除率。

(2) 加热时间对 PQQH₂ 稳定性的影响:配制 30, 50, 70 mg/L PQQH₂ 标准溶液,分别在相同温度(100 °C)、不同时间(4, 8, 12, 24 h)下进行水浴反应,测定 PQQH₂ 对 ABTS 自由基的清除率。

试验重复 3 次,测定方法参照 1.2.1,以维生素 C 为阳性对照,对 PQQH₂ 各项指标作出评价。

2 结果分析

2.1 清除 ABTS 自由基的反应动力曲线

如图 2 所示,反应前 10 min 内,ABTS 自由基清除率随反应时间的延长显著提高,PQQH₂ 质量浓度越高,清除效率越高,10 min 后 ABTS 自由基清除速率降低,清除

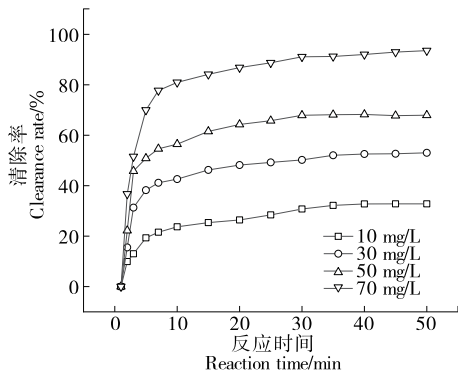


图2 不同浓度PQQH₂清除ABTS自由基的反应动力曲线

Figure 2 Kinetic curves of scavenging effects of different concentrations of PQQH₂ on ABTS radical

率无显著变化,反应逐渐趋于平衡。并且相同反应条件下,提高PQQH₂的质量浓度,ABTS自由基清除率也显著提高,70 mg/L PQQH₂相较于10 mg/L PQQH₂对ABTS自由基的清除率提升了约3倍,达到了95%左右。试验结果表明,ABTS自由基清除率与PQQH₂的质量浓度呈正比。

对不同质量浓度PQQH₂清除ABTS自由基反应进行准一级、准二级动力学方程拟合,结果见图3、图4,相应动力学参数见表1。准一级动力学模型拟合相关系数均在0.9以下,线性相关较差。而准二级动力学模型拟合的线性相关系数为0.959~0.996,因此,PQQH₂清除ABTS自由基采用准二级动力学模型,二级反应速率常数随PQQH₂质量浓度的增加而增大。二级反应速率常数能够反映抗氧化物质的自由基清除能力,其值越大,清除自由基的能力越强。

2.2 清除ABTS自由基的IC₅₀值

如图5所示,ABTS自由基清除率与PQQH₂和维生

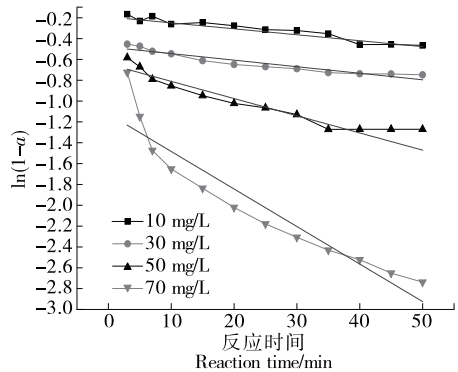


图3 PQQH₂清除ABTS自由基准一级反应动力学方程的拟合图线

Figure 3 Fitting curve of the kinetic equation of the quasi-first order reaction of PQQH₂ clearing ABTS radical

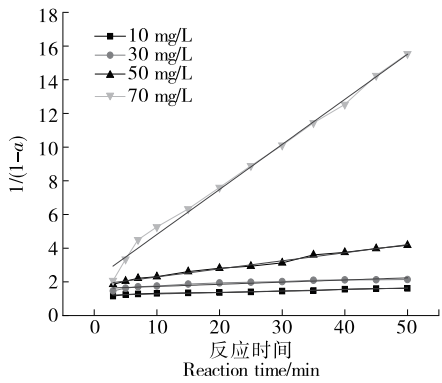


图4 PQQH₂清除ABTS自由基准二级反应动力学方程的拟合图线

Figure 4 Fitting curve of the kinetic equation of the quasi-second order reaction of PQQH₂ clearing ABTS radical

表1 动力学模型拟合参数

Table 1 Kinetic parameters for PQQH₂ to ABTS ·

PQQH ₂ 初始质量浓度 C ₀ /(mg·L ⁻¹)	准一级动力学模型		准二级动力学模型	
	k ₁	R ²	k ₂	R ²
10	0.032 1	0.893 0	0.008 3	0.984 2
30	0.038 2	0.788 8	0.054 0	0.958 8
50	0.078 1	0.876 9	0.215 4	0.988 0
70	0.042 3	0.871 0	1.205 7	0.996 1

素C在一定质量浓度范围内呈线性关系,ABTS自由基清除率与PQQH₂、维生素C的质量浓度呈正比。当PQQH₂质量浓度为0~90 mg/L时,对ABTS自由基的清除率随着质量浓度的增大而升高,清除率可高达95%左右,但之后随着PQQH₂质量浓度的增加,清除率虽然也在增加,但增长速率显著降低,清除率最终保持平稳不变。PQQH₂清除ABTS自由基IC₅₀值约为30 mg/L,即90 μmol/L,而维生素C清除ABTS自由基的IC₅₀值约为

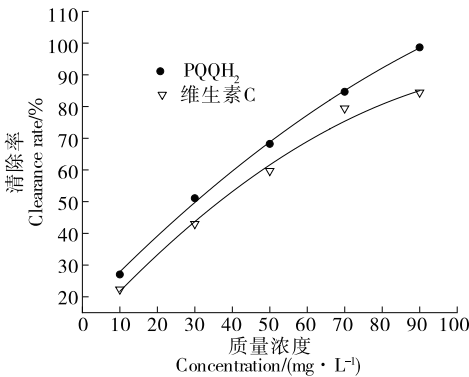


图5 PQQH₂、维生素C对ABTS自由基清除能力的变化

Figure 5 ABTS radical scavenging capacity of PQQH₂, V_c

38 mg/L,即 176 $\mu\text{mol/L}$ 。PQQH₂ 的 IC₅₀ 值是维生素 C 的 51.14%,说明 PQQH₂ 比维生素 C 更适合作为一种快速清除自由基的抗氧化剂。

2.3 PQQH₂与维生素 C 清除 ABTS 自由基的反应动力学比较

通过研究相同质量浓度(70 mg/L)的 PQQH₂与维生素 C 清除 ABTS 自由基的反应动力学,结果见图 6。由图 6 可知,相同质量浓度时,PQQH₂ 的抗氧化性要高于维生素 C 的。反应 25 min 时,PQQH₂ 对 ABTS 自由基的清除率可达到 90%以上,而维生素 C 对 ABTS 自由基的清除率仅能达到 78%。

2.4 热稳定性研究

2.4.1 加热温度对 PQQH₂ 稳定性的影响 如图 7 所示,在加热时间相同的条件下,随着加热温度的升高,PQQH₂和维生素 C 对 ABTS 自由基的清除能力均呈下降趋势,可能是由于加热导致抗氧化活性基团损失。加热温度由 30 $^{\circ}\text{C}$ 升高到 100 $^{\circ}\text{C}$,相同质量浓度的维生素 C 对 ABTS 自由基清除能力损失比 PQQH₂ 多 2~3 倍。说

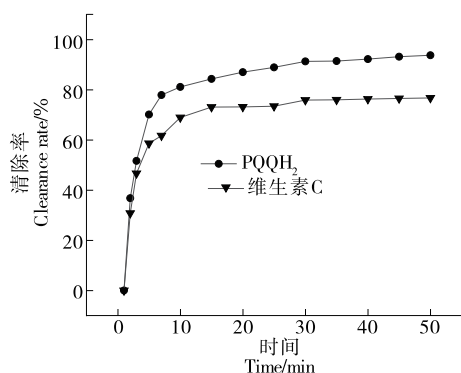


图 6 PQQH₂和 维生素 C 清除 ABTS 自由基的反应动力学曲线

Figure 6 Kinetic curves of scavenging effects of PQQH₂ and V_C on ABTS radical

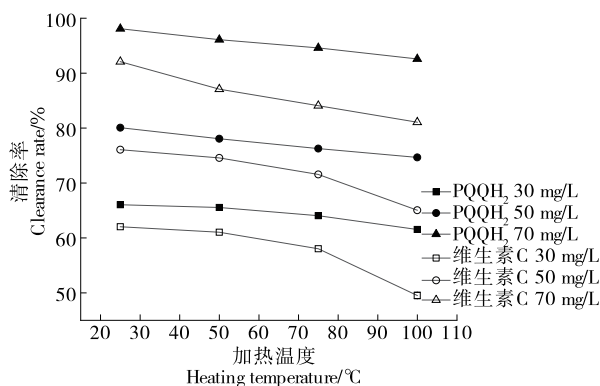


图 7 加热温度对清除率的影响

Figure 7 The effect of heating temperature on removal rate

明 PQQH₂ 表现出的热稳定性要高于维生素 C,当加热时间相同时,PQQH₂ 的稳定性更高,对 ABTS 自由基清除能力损失更小,PQQH₂ 即使在高温条件下,也依然能够保持自身结构的稳定性,从而展现突出的抗氧化特性。

2.4.2 加热时间对 PQQH₂ 稳定性的影响 如图 8 所示,当加热温度一定,随着加热时间的延长,维生素 C 表现出的抗氧化活性能力的降低幅度显著高于 PQQH₂,约为 PQQH₂ 的 3~7 倍。相较于维生素 C,PQQH₂ 具有稳定的结构,在高温条件下,依然能够保持优良的抗氧化性能。维生素 C 因其具备的抗氧化特性被广泛应用于食品中,但基于自由基清除能力、热稳定性等指标,PQQH₂ 比维生素 C 更适合作为食品抗氧化剂。

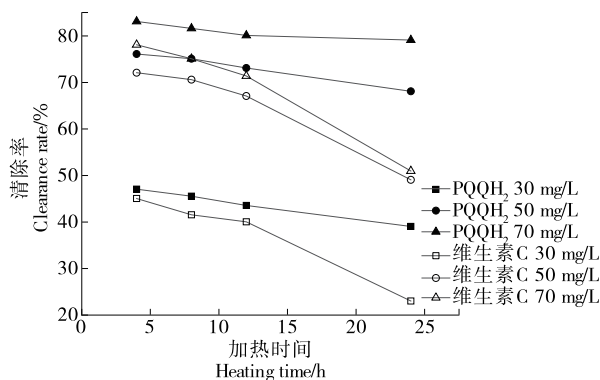


图 8 加热时间对清除率的影响

Figure 8 Effect of heating time on removal rate

3 结论

研究检测了 10,30,50,70 mg/L 4 种质量浓度下还原态吡咯喹啉醌对 ABTS 自由基的清除能力,结果表明,浓度越高,清除能力就越强。当还原态吡咯喹啉醌的质量浓度为 70 mg/L 时,反应 25 min,ABTS 自由基的清除率可达到 90%以上,说明还原态吡咯喹啉醌具有一定的抗氧化能力。根据反应动力学模型,二级动力学拟合方程更能描述还原态吡咯喹啉醌对 ABTS 自由基的清除能力,相关系数为 0.959~0.996。还原态吡咯喹啉醌比维生素 C 具有更好的抗氧化活性,有望将其开发为一种天然的抗氧化剂。

参考文献

- [1] MARTINS A M, LATHAM J A, MARTEL P J, et al. A two-component protease in *Methylobacterium extorquens* with high activity toward the peptide precursor of the redox cofactor pyrroloquinoline quinone[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(41): 15 025-15 036.
- [2] HARRIS C B, CHOWANADISAI W, MISHCHUK D O, et al. Dietary pyrrolo-quinoline quinone (PQQ) alters indicators of inflammation and mitochondrial-related metabolism in human subjects[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2013, 24(12): 2 076-2 084.

(下转第 46 页)

定碳质量分数升高;各涂布率再造烟叶的热失重过程均可分为干燥脱水、低沸点挥发分析出、半纤维素分解、纤维素及木质素分解及炭化阶段 5 个阶段,随涂布率由 35% 增加到 50%,挥发分起始析出温度由 220.2 °C 降低至 196.0 °C,终止析出温度有提高趋势;综合热解指数随涂布率增加而降低,表明较低涂布率的再造烟叶综合热解特性较好。基于单一升温速率的 Coats-Redfern 动力学分析表明 F1.5 化学反应模型可较好地描述再造烟叶在各热解条件下的分解过程。纤维素及木质素分解阶段的反应活化能高于半纤维素分解热解阶段,升温速率均为 20 °C/min 时,半纤维素分解阶段的活化能随涂布率增加逐渐升高,纤维素及木质素分解阶段的活化能变化幅度较小,且各阶段热解动力学参数间满足动力学补偿效应。热解气体在线红外分析表明热解过程中的挥发性成分主要是小分子气体(如 H₂O、CH₄、CO₂、CO 等)和轻质焦油组分(如醛酮酸和酚类等),其中 CO₂ 气体释放量显著高于其他成分,其次是 C=O 代表的醛酮酸类成分、C=C 代表的芳香烃类成分及水分释放。

参考文献

- [1] 郑庆元, 谢俊明, 唐英杰, 等. 再造烟叶涂布液黏度调控系统的设计与实现[J]. 造纸科学与技术, 2019, 38(4): 1-3.
- [2] 鹿洪亮, 李跃锋, 李易非, 等. 应用接触角技术评价再造烟叶涂布液的动态吸收性能[J]. 烟草科技, 2019, 52(9): 96-101.
- [3] 许春平, 孟丹丹, 朱国成, 等. 紫外辐照对再造烟叶涂布液挥发性香味成分的影响[J]. 轻工学报, 2019, 34(6): 24-32.
- [4] 宋光富, 张艇, 薛芳, 等. 采用乙醇提取及喷香方式对造纸法再造烟叶品质的影响[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2020, 42(3): 146-155.
- [5] 叶建斌, 王璐, 杨峰, 等. 类芽孢杆菌发酵原料浸提液提升再造烟叶品质[J]. 中国烟草学报, 2019, 25(1): 33-38.
- [6] 朱宏福, 堵劲松, 常纪恒, 等. X 射线法无损测定造纸法再造烟叶涂布率[J]. 烟草科技, 2019, 52(6): 99-104.
- [7] 惠建权, 李涵, 卫青, 等. 涂布率对再造烟叶综合品质的影响[J]. 光谱实验室, 2012, 29(3): 1 729-1 733.
- [8] LIANG Miao, ZHANG Ke, LEI Ping, et al. Fuel properties and combustion kinetics of hydrochar derived from co-hydrothermal carbonization of tobacco residues and graphene oxide[J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2020, 10(1): 189-201.
- [9] FAN Yu-yang, LI Lu-wei, NAKORN Tippyawong, et al. Quantitative structure-reactivity relationships for pyrolysis and gasification of torrefied xylan[J]. Energy, 2019, 188: 116119.
- [10] LEI Zhi-hui, WANG Sheng-dan, FU Hao-cheng, et al. Thermal pyrolysis characteristics and kinetics of hemicellulose isolated from Camellia Oleifera Shell [J]. Bioresource Technology, 2019, 282: 228-235.
- [11] MA Zhong-qing, CHEN Deng-yu, GU Jie, et al. Determination of pyrolysis characteristics and kinetics of palm kernel shell using TGA-FTIR and model-free integral methods[J]. Energy Conversion and Management, 2015, 89: 251-259.
- [12] SRIRAM A, SWAMINATHAN G. Pyrolysis of Musa balbisiana flower petal using thermogravimetric studies[J]. Bioresource Technology, 2018, 265: 236-246.
- [13] TIAN Ling-hui, SHEN Bo-xiong, XU Huan, et al. Thermal behavior of waste tea pyrolysis by TG-FTIR analysis[J]. Energy, 2016, 103: 533-542.
- [14] CHEN Deng-yu, LIU Dong, ZHANG Hong-ru, et al. Bamboo pyrolysis using TG-FTIR and a lab-scale reactor: Analysis of pyrolysis behavior, product properties, and carbon and energy yields[J]. Fuel, 2015, 148: 79-86.
- [15] MITCHELL A E, JONES A D, MERCER R S, et al. Characterization of pyrroloquinoline quinone aminoacid derivatives by electrospray ionization mass spectrometry and detection in human milk[J]. Analytical Biochemistry, 1999, 269(2): 317-325.
- [16] IKEMOTO K, MORI S, MUKAI K. Synthesis and crystal structure of pyrroloquinoline quinol (PQQH₂) and pyrroloquinoline quinone (PQQ) [J]. Acta Crystallographica Section B: Structural Science, 2017, 73(3): 489-497.
- [17] SHANKAR B, PANDEY R, AMIN P, et al. Role of glutathione in augmenting the anticancer activity of pyrroloquinoline quinone (PQQ) [J]. Redox Report, 2010, 15(4): 146-154.
- [18] SHEN Jian-gang. Reactive nitrogen species: Dual roles for blood brain barrier disruption and brain repairs in cerebral ischemia and reperfusion injury[J]. Acta Biophysica Sinica, 2012, 28(4): 295-306.
- [19] 张光银, 张军平. 益肾健脾涤痰散结法治疗心脑血管疾病的机制研究[J]. 辽宁中医杂志, 2016(4): 734-735.
- [20] 冯学珍, 伍善广, 韦啟球, 等. 网地藻多糖清除 DPPH· 自由基活性的动力学研究[J]. 广西植物, 2017, 37(5): 647-652.

(上接第 9 页)

- [3] SATO K, TORIYAMA M. Effect of pyrroloquinoline quinone (PQQ) on melanogenic protein expression in murine B16 melanoma[J]. Journal of Dermatological Science, 2009, 53(2): 140-145.
- [4] KIM J, KOBAYASHI M, FUKUDA M, et al. Pyrroloquinoline quinone inhibits the fibrillation of amyloid proteins[J]. Prion, 2010, 4(1): 26-31.
- [5] HARA H, HIRAMATSU H, ADACHI T. Pyrroloquinoline quinone is a potent neuroprotective nutrient against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity [J]. Neurochemical Research, 2007, 32(3): 489-495.
- [6] KUMAZAWA T, HIWASA T, TAKIGUCHI M, et al. Activation of ras signaling pathways by pyrroloquinoline quinone in NIH3T3 mouse fibroblasts[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2007, 19(5): 765-770.
- [7] DUINE J A, FRANK JZN J, JONGEJAN J A. PQQ and quinoprotein enzymes in microbial oxidations[J]. FEMS Microbiology Letters, 1986, 32(3): 165-178.

- [8] MITCHELL A E, JONES A D, MERCER R S, et al. Characterization of pyrroloquinoline quinone aminoacid derivatives by electrospray ionization mass spectrometry and detection in human milk[J]. Analytical Biochemistry, 1999, 269(2): 317-325.
- [9] IKEMOTO K, MORI S, MUKAI K. Synthesis and crystal structure of pyrroloquinoline quinol (PQQH₂) and pyrroloquinoline quinone (PQQ) [J]. Acta Crystallographica Section B: Structural Science, 2017, 73(3): 489-497.
- [10] SHANKAR B, PANDEY R, AMIN P, et al. Role of glutathione in augmenting the anticancer activity of pyrroloquinoline quinone (PQQ) [J]. Redox Report, 2010, 15(4): 146-154.
- [11] SHEN Jian-gang. Reactive nitrogen species: Dual roles for blood brain barrier disruption and brain repairs in cerebral ischemia and reperfusion injury[J]. Acta Biophysica Sinica, 2012, 28(4): 295-306.
- [12] 张光银, 张军平. 益肾健脾涤痰散结法治疗心脑血管疾病的机制研究[J]. 辽宁中医杂志, 2016(4): 734-735.
- [13] 冯学珍, 伍善广, 韦啟球, 等. 网地藻多糖清除 DPPH· 自由基活性的动力学研究[J]. 广西植物, 2017, 37(5): 647-652.