# 槲皮素的共振光散射光谱研究

## 曾铭,李树伟\*,邓嘉利,李小燕,赵可清

四川师范大学化学学院,四川 成都 610066

摘 要 研究了槲皮素(Qu)的共振光散射光谱和吸收光谱,结果表明,pH 在 31 30~61 50 范围内,Qu 的共振光散射信号很强且稳定,当 pH > 61 50 时,共振光散射强度随 pH 的增大而迅速减小。在 pH 41 00 的 B2R 缓冲溶液中,在  $\leftarrow$  497 nm 处,共振光散射强度在一定浓度范围内与 Qu 的浓度成线性关系,线性范围为 01 0~31 0@10 4 mol# L<sup>-1</sup>,相关系数 r > 01 999,检测限为 31 1@10 7 mol # L<sup>-1</sup>。同时运用量子化学计算方法对 Qu 分子内、分子间氢键进行了计算,理论计算表明:Qu 共振光信号增强的原因是 Qu 分子通过 42.4. 分子间氢键聚合形成了超分子聚合体,这一结论和实验得到的光谱数据完全吻合。

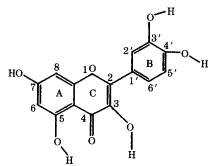
主题词 共振光散射; 槲皮素; 超分子; 氢键

中图分类号: O65713 文献标识码: A 文章编号: 100020593(2006)0220317204

光散射技术在物理化学、胶体化学和高分子化学研究中具有十分重要的地位,但是在分析化学领域中尚未得到充分应用。1993 年,Pasternack<sup>11</sup>等使用普通荧光光度计研究了卟啉类化合物在核酸上的聚集,在激发光波长  $K_{\rm ex}$ 等于发射光波长  $K_{\rm ex}$ 的条件下,荧光光度计的激发和发射单色器同步扫描,即可获得在 90b 角方向的散射光谱。这种共振光散射光谱(resonance light scattering,RLS)在研究生物大分子的识别、组装和聚集时出现灵敏而丰富的信号。因此,近几年来,共振光散射技术成为一种发展十分迅速的痕量分析测试技术,在生命科学、环境科学以及纳米材料研究等领域都显示出广阔的应用前景。虽然目前共振光散射技术在蛋白质<sup>[24]</sup>、核酸<sup>[5,6]</sup>、有机药物<sup>[7]</sup>和金属离子<sup>[8]</sup>分析中应用广泛,但是对共振光增强的机理缺乏全面的了解,还需要做大量的试验研究和理论探讨工作。

槲皮素(quercetin, Qu)是一种多羟基的黄酮类化合物,它的结构式如图 1。由于其结构是大共轭体系且有多酚羟基,所以是一种很好的抗氧化剂,有较强的生物活性。在医学领域,槲皮素广泛用于治疗慢性支气管炎,对冠心病、高血压有一定的辅助治疗作用,同时也具有明显的增强 免疫功能、抗肿瘤、抗衰老作用及抗病毒、抗菌、镇痛的作用[9]。本文发现,Qu在弱酸性条件下,可以产生灵敏的共振光散射信号,RLS强度与pH值和Qu浓度有关。在一定的条件下,共振光散射强度与pH的关系进行了深入的研究,目的在于了解共振光散射产生的机理,影响共振光散射光谱的因素以及共振

光散射强度与被测物浓度之间的定量关系等基础问题。理论计算的结果证实了在弱酸性条件下 Qu 产生灵敏的共振光散射峰的原因是 Qu 分子通过分子间氢键作用形成了超分子聚合物,并且从理论上得出了 4 位羟基上的氢原子与 4 位羰基氧原子之间形成分子间氢键最为有利的结论。



Figl 1 Molecular structure of Qu

## 1 实验部分

#### 111 主要仪器和药品

RE540 荧光分光光度计(日本岛津公司);自动电位滴定计(上海雷磁仪器厂); TU21001 紫炉2可见光分光光度计(北京市通用仪器设备公司); Il 0@10 5 mol# L-1 槲皮素(中国药品生物制品检定所,纯度大于99%); Britton2Robinson缓冲溶液(简写为 BR 缓冲溶液), NaA&HAc 缓冲溶液, Clark2Lubs 缓冲溶液按照(常文保,等.简明分析化学手册.

**收稿日期**: 200**∑**02218, **修订日期**: 200**∑**0**②**26 **基金项目**: 国家自然科学基金(50473062)资助项目

作者简介: 曾 铭, 1975 年生, 四川师范大学化学学院硕士研究生 \* 通讯联系人

北京大学出版社, 1981. 262~ 265 页)的方法配制, 实验用水均为两次蒸馏水。

### 112 实验方法

在一系列 10 mL 具塞比色管中依次加入 3 mL pH 41 00 的  $\mathbf{E}\mathbf{R}$  缓冲溶液和一定体积槲皮素溶液( $11 0 @ 10^{-4} \text{ mol} \#$   $\mathbf{L}^{-1}$ ),用两次蒸馏水稀释到刻度,摇匀,反应 30 min,用紫 92可见光光度计记录其吸收光谱;用  $\mathbf{RE}540$  荧光分光光度计,同步扫描记录共振光散射光谱。在  $\mathbf{K}_{ex} = \mathbf{K}_{em} = 497 \text{ nm}$  处 测定体系的共振光散射强度及试剂空白。

## 2 结果与讨论

### 21.1 体系的吸收光谱和共振光散射光谱

pH 4 00,不同浓度的槲皮素溶液的共振光散射光谱如图 2 所示,在497 和 574 nm 出现两个强的共振光散射峰。在497 nm 处的共振光散射峰强度最大,本实验选用 497 nm 作为定量分析的波长。

图 3 为槲皮素的吸收光谱。在 pH 4 00 时, ll 0 @10 4 mol# L · 1 Qu 的吸收曲线为 1; 当 pH 7 80 时, ll 0 @10 4 mol# L · 1 Qu 的吸收曲线为 2。Qu 在 200~750 nm 存在 2 个主要的紫外吸收带,谱带 Ñ (330~400 nm) 和谱带 Й (230~280 nm),而在碱性溶液中,谱带 Ñ 红移,且吸收强度略有增加,主要是因为 Qu 母核上的酚羟基在碱性条件下均可离解。由图可知,Qu 对于波长大于 480 nm 的入射光几乎没有吸收,这可表明在 Qu 体系的测定中,入射光进入体系在 497,

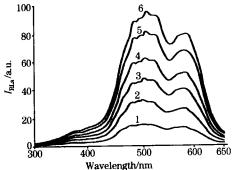
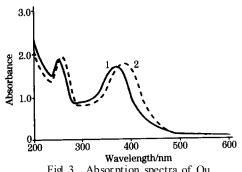


Fig 2 Resonance light scattering spectra of Qu concentrations( @10<sup>-5</sup> mol # L<sup>-1</sup>)
1, 014; 2, 018; 3, 112; 4, 116; 5, 210; 6, 214



Figl 3 Absorption spectra of Qu 1, pH 4 00; 2, pH 7 80

574 nm 处所产生的共振光现象是一种无能量损失的共振光散射。

## 212 试验条件的选择

#### 21211 试验时间的影响

按照实验方法进行测定,Qu体系的共振光散射强度在015~3h内基本保持稳定,实验选择反应时间为30min。

#### 21212 缓冲溶液的选择及酸度的影响

实验了三种不同的缓冲溶液, B2R 缓冲溶液、NaAe HAc 缓冲溶液和 Clark2 Lubs 缓冲溶液对 Qu 共振光光散射强度的影响,测定结果发现,不同缓冲溶液对共振光散射强度的影响很小。我们选用了pH 范围较大的 B2R 缓冲溶液作为缓冲试剂。酸度对体系的共振光散射强度影响非常显著,如图 4 所示,当pH 在 31 30~ 61 50 范围内时,共振光散射强度十分稳定,当pH> 61 50 时,共振光散射强度突然开始减弱,在pH>71 80 时,共振光散射峰基本消失。我们认为主要原因是在酸性环境中 Qu分子之间通过氢键形成了超分子聚合体而导致共振散射峰增强,而在碱性环境中,氢氧根离子进攻羟基氢,结合形成水分子,破坏由氢键而形成的超分子聚合物体系,导致共振峰强度迅速减弱直至消失。

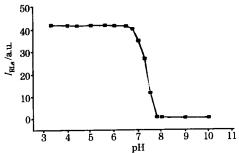


Fig 4 Change in RLS intensity with pH values

#### 21213 表面活性剂的影响

在 Qu 物质的量浓度为 11 0 @ 10 ° 5 mol # L · 1, pH 为 41 00 的 ER 缓冲溶液中,分别加入阳离子表面活性剂溴化十六烷基三甲基铵(CTMAB, 1%),阴离子表面活性剂十二烷基苯磺酸钠(SDBS, 1%)、十二烷基磺酸钠(SDS, 1%)及非离子表面活性剂 Tween280(1%),OP(1%) 共 5 种不同的表面活性剂,在 497 nm 出测定体系的共振光散射强度并测量其空白值。实验结果发现,阴离子表面活性剂(SDS, SD2 BS)和阳离子表面活性剂(CTMAB)对槲皮素体系的共振光散射强度并无明显影响;非离子表面活性 Tween280,OP 的加入使槲皮素体系的共振峰消失,主要原因可能是非离子表面活性剂使溶质分子间距离增大,分子间的作用力减小,槲皮素分子间难以形成氢键而生成超分子聚合物;而阴、阳离子型表面活性剂对槲皮素体系的共振光散射强度无影响说明了超分子聚合物并不是通过阴阳离子间的静电作用所形成的。

### 214 共振光散射强度与浓度之间的关系

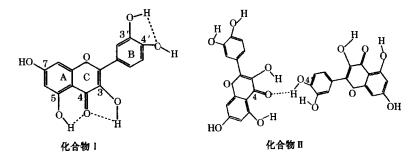
Table 1 Analytical parameters of the determination

Wave length $K_{ex} = K_{em}$	Linear regression equation	Correlation coefficient	Limit of detection/ (mol# L <sup>-1</sup> )
497 nm	I = 11 473+ 31 908 @c(@10 <sup>-6</sup> mol# L <sup>-1</sup> )	01 999 4	31 1@10-7
574 nm	$I = 01 987 + 31277 @c(@10^{-6} mol # L^{-1})$	01 999 7	51 4@10-7

程的斜率),结果列于表1。

#### 21.5 槲皮素分子间氢键的理论研究

为了解释图 4 给出的 pH 值对共振光散射光谱的影响, 我们选用量子化学从头算方法 HF/ST Q23G 和密度泛函方法 B3LYP/ Q31G\*对槲皮素分子内氢键作出了理论研究。根据 槲皮素分子的结构式可知,在酸性条件下,Qu主要以分子 形式存在, Qu 分子中 3, 5, 7, 3. 和 4 位羟基上的氢原子带有正电荷, Qu 分子 C 环 4 位上的羰基氧原子电负性较高, Qu 分子通过氢键作用可以形成分子内氢键和分子间氢键。图 5 为槲皮素形成分子内氢键(化合物 Ñ)和 424. 分子间氢键(化合物 Ö)的示意图。



Figl 5 Molecular structure of complex N and O

表 2 中列出了计算得到的化合物 N 中氢键的键长和键能,键长越短,键越牢固。因此,4位氧原子与5位羟基上氢原子形成的氢键较为牢固。

Table 2 Bond distance and total energy of hydrogen2 bond in bomplex Ñ

化合物Ñ	氢键	键长/nm	总能量/(kcal#mol-1)
HF/ST 023G	H(3)) O(4)	01 206 0	- 6791 433 7
	H(5)) O(4)	01 168 2	
	H(3.))O(4.)	01 210 0	

在讨论分子间氢键时,由于研究的体系过大,所以我们选用量子化学 Hartre2Fork 方法,在较小的 STO23G 基组水平上对槲皮素分子间氢键进行理论研究,对其作了几何构型优化和自然轨道分析(加关键词 POP= NBO)。表 3 中列出了

由分子间氢键作用形成的五种可能化合物的部分结构参数和能量参数。计算结果表明: (1)由于分子间氢键的形成,促使参与氢键形成的 4 位氧原子所在的 C 环与它相连的 B 环发生一定的扭转,共轭体系在一定程度上被破坏。(2)从键长的角度看,化合物ò中 4 位羟基上的氢原子与 4 位原子之间形成分子间氢键键长最短,则该氢键最为牢固;从二级稳定化能大小来看,该分子间氢键的二级稳定化能最大,也说明其牢固性最强。因此,我们可以发现 4 位羟基上的氢原子与 4 位羰基氧原子之间形成分子间氢键最为有利。(3)从总能量来看,体系中若无分子间氢键,其总能量为-1 3581 867 4 kcal# mol<sup>1</sup>,但是当分子间氢键的形成时,体系的总能量都有所下降,从而使得其稳定性增加。化合物ò在五种可能化合物中能量最低,是最稳定的,也说明了 4 位羟基上的氢原子与 4 位羰基氧原子之间形成分子间氢键最牢固。

Table 3 Selected geometric parameters and energy parameters for five complexes

HF/STO23G	键长/nm	C 环与 B 环扭转角/(b)	二级稳定化能/(kcal# mol-1)	总能量/(kcal# mol-1)
Complex 0	H(4.)) O(4) = 01 152 0	181 840	301 73	- 1 3581 872 08
Complex Ó	H(3.)) O(4) = 01 170 1	191 946	31 44	- 1 3581 870 45
Complex 0	H(7)) $O(4) = 011536$	211 862	301 39	- 1 3581 871 99
Complex 0	H(3)) $O(4) = 01 162 1$	121 990	271 05	- 1 3581 871 96
Complex Ö	H(5) ) $O(4) = 012326$	151 770	11 99	- 1 3581 871 40

因此,通过运用量子化学 Hart re & Fork 方法, 我们得到如下结论: 槲皮素在酸性条件下,通过分子间氢键作用可以聚集成超分子聚合物,从而产生强烈的共振光散射现象。从pH、表面活性剂对共振光散射峰的影响也可以证明这一结

论。

## 216 结束语

由以上实验结果和理论计算,可以得如下结论: (1)体系的共振光散射强度随槲皮素浓度的增大而增强,具有较好

1、表面沾饪剂对共振 光散 射峰的 影响 也可以证明这一结 系的共振光散射强度随 棚及系浓度的增入而增强,具有较处 ◎ 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House, All rights reserved. http://www.cnki.net 的线性关系,这可以成为槲皮素定量分析的新方法; (2)在酸性条件下, 槲皮素分子之间通过氢键[H(4.)) O(4)]聚集

形成超分子聚合体, 是共振光散射增强的内在原因。

### 参 考 文 献

- [1] Pasternack R F, Bustamante C, Collings P J. J. Am. Chem. Soc., 1993, 115: 5393.
- [2] LI Shu2wei, LI Na, ZHAO Fenglin, et al(李树伟,李 娜, 赵凤林,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(4): 619.
- [3] ZHANG Hongyi, LIU Ba@sheng, ZHANG Honglei, et al(张红医, 刘保生, 张红蕾, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(6): 1054.
- [4] FENG Ning chuan, HE Su2ping, ZHANG Juan, et al(冯宁川,何苏萍,张 娟,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(2): 194.
- [5] SU Jieshu, CHEN Xiao ming, LONG Yun2fei, et al(苏界殊, 陈小明, 龙云飞, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(1): 37.
- [6] REN L2 ping, JIANG Shu2ren, RAO Zhen2hong, et al (任丽萍, 江树人, 饶震红, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(10): 1213.
- [7] FAN Li, LIU Shac2pu, YANG Da2 cheng(范 莉, 刘绍璞, 杨大成). Journal of Instrumental Analisis(分析测试学报), 2003, 22(1): 27.
- [8] WANG Xiao2hong, LI Shu2wei, et al(王小红, 李树伟, 等). Journal of Sichuan Normal University (Nature Science) (四川师范大学学报 # 自然科学版), 2004, 27(2): 198.
- [9] SONG Yu2qiao, YAO Lingyun, et al. (宋玉乔, 姚凌云, 等). Journal of Northwest Pharmicy(西北药学杂志), 2002, 17(1): 41.

## Resonance Light Scattering of Quercetin

ZENG Ming, LI Shu²wei\*, DENG Jia²li, LI Xiao²yan, ZHAO Ke²qing College of Chemistry, Sichuan Normal University, Chengdu 610066, China

Abstract Resonance light scattering (RLS) and absorption spectra of Quercetin were studied in the present paper. In the solu2 tion with pH 3I 30 to pH 6I 50, the RLS singal was very strong and stable, but decreased sharply with a increase in pH when pH > 6I 50. In the PLR buffer solution at pH 4I 00, the RLS intensity at 497 nm was maximum and proportional to the concentra2 tion of quercetin. The linear range is 0I 0L3I 0@10<sup>-4</sup> mol# L<sup>-1</sup> with the detection limit of 3I 1@10<sup>-7</sup> mol# L<sup>-1</sup>. Quantum chem2 istry calculation showed that this enhancement of RLS occurred because the neutral molecules of quercetin assembled into super2 molecular aggregates by 424 hydrogen2bond. This result completely accords with the spectral data from experiments.

Keywords Resonance light scattering; Quercetin; Upermolecular; Hydrogen2bond

(Received Feb. 18, 2005; accepted Jun. 26, 2005)

\* Corresponding author