# 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 E2R 缓冲溶液中,在 k 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<sup>-4</sup> mol# L<sup>-1</sup>,相关系数 r > 01 999,检测限为 31 1@10<sup>-7</sup> 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 424.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>[1]</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<sub>6</sub>等于发射 光波长K<sub>en</sub>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<sup>[9]</sup>。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Qu浓度有较好的线性关系。本文对共振光 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 紫外2可见光分光光度计(北 京市通用仪器设备公司); 110@10<sup>5</sup> mol#L<sup>-1</sup>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 B2R 缓冲溶液), NaA2HAc 缓冲溶液, Clark2Lubs 缓冲溶液按照(常文保,等. 简明分析化学手册.

基金项目: 国家自然科学基金(50473062)资助项目

收稿日期: 200至02218, 修订日期: 200至0@26

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 E2R 缓冲溶液和一定体积槲皮素溶液(110@10<sup>-4</sup> mol # L<sup>-1</sup>),用两次蒸馏水稀释到刻度,摇匀,反应 30 min,用紫 %2可见光光度计记录其吸收光谱;用 RE2540 荧光分光光度 计,同步扫描记录共振光散射光谱。在  $K_{ex} = K_{m} = 497$  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

### 211 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, 11 0 @10<sup>4</sup> mol# L<sup>-1</sup> Qu 的吸收曲线为 1; 当 pH 7 80 时, 11 0 @10<sup>4</sup> mol# L<sup>-1</sup> 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Ò (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,



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。 2122 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、NaA& HAc缓冲溶液和 Clark2Lubs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 3 30~ 6 50 范围内时,共振光散射强 度十分稳定,当 pH > 6 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。



#### 21213 表面活性剂的影响

在 Qu 物质的量浓度为 11 0 @10<sup>5</sup> mol # L<sup>-1</sup>, pH 为 41 00 的 B2R 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

实验发现当Qu浓度在QO~3Q@10<sup>-4</sup> mol # L<sup>-1</sup>范围 内,体系的共振光散射强度与Qu浓度之间存在较好的线性 关系,检测限按3DK计算(D为空白标准偏差,K为回归方

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Table I Analytical barameters of the determination	Table 1	Analytical	par ameters of	the d	eterminatio
--	---------	------------	----------------	-------	-------------

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

程的斜率),结果列于表1。

#### 215 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 O23G 和密度泛函方法 B3LYP/ O21G\* 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Ň)和424.分子间氢键 (化合物Ň)的示意图。



Fig 5 Molecular structure of complex  $\tilde{N}$  and  $\dot{O}$ 

表 2 中列出了计算得到的化合物Ň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 $\tilde{N}$

化合物Ñ	氢键	键长/nm	总能量/(kcal # mol <sup>-1</sup> )
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 2 1 0 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 Hartree2 Fork 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-135818674 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	l energy parameters for five complexe	es
---	---------------------------------------	----

HF/ST023G	键长/nm	C 环与 B 环扭转角/(b)	二级稳定化能/(kcal# mol <sup>-1</sup> )	总能量/(kcal# mol <sup>-1</sup> )
Complex Ò	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	- 1 358 870 45
Complex Ô	H(7)) $O(4) = 011536$	211 862	301 39	- 1 358 871 99
Complex Õ	H(3)) O(4) = 01 162 1	121 990	271 05	- 1 358 871 96
Complex Ö	H(5)) O(4) = 01 232 6	151 770	11 99	- 1 3581 871 40

因此,通过运用量子化学 H art ree2 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 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

pH、表面活性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槲皮素浓度的增大而增强,具有较好 © 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 Hong2yi, LIU Ba&sheng, ZHANG Hong2lei, 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 Ji@shu, CHEN Xia@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 Sha@pu, 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 Ling2yun, 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<sup>\*</sup>, 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 solu tion with pH 3 30 to pH 6 50, the RLS singal was very strong and stable, but decreased sharply with a increase in pH when pH > 6 50. In the B2R buffer solution at pH 4 00, the RLS intensity at 497 nm was maximum and proportional to the concentral tion of quercetin. The linear range is 0 0231 0@10<sup>-4</sup> mol# L<sup>-1</sup> with the detection limit of 31 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