

## 锌离子存在下槲皮素、杨梅素与牛血清蛋白的结合

蒋新宇<sup>1</sup> 李文秀<sup>1</sup> 陈景文<sup>\*2</sup>

(<sup>1</sup> 中南大学化学化工学院, 长沙 410083)

(<sup>2</sup> 盐城工学院化学与生物工程学院, 盐城 224051)

**摘要:** 采用荧光、紫外及红外等光谱方法研究了在水溶液中锌离子对槲皮素、杨梅素与牛血清蛋白(BSA)相互作用的影响。槲皮素和杨梅素均能使 BSA 的荧光发生淬灭,表明两种药物与 BSA 发生了结合。锌离子的加入则能进一步导致 BSA 的荧光淬灭,同时,使 BSA 的特征发射光谱产生了显著的蓝移,其中锌离子对杨梅素的影响甚于槲皮素,表明锌离子的存在能够显著影响两种药物与 BSA 的相互作用,其影响的程度与药物分子结构中 B 环的羟基数相关。定量计算表明,加入锌离子后 2 种药物与 BSA 间的结合常数显著降低、结合位点数减小。红外和紫外吸收光谱结果显示,锌离子与槲皮素、杨梅素发生了配位反应,形成了新的配合物。可以推断,在锌离子存在下,槲皮素和杨梅素与 BSA 的结合在很大程度上分别是两种药物的锌配合物与其相互作用,槲皮素、杨梅素等黄酮类药物 B 环羟基数的增加能够使药物与 BSA 的结合能力增强,而锌离子的存在反而使其结合能力减弱。

**关键词:** 荧光光谱; 红外光谱; 牛血清蛋白; 锌离子; 槲皮素; 杨梅素

中图分类号: O614.24<sup>1</sup> 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2008)10-1588-08

## Binding of Quercetin, Myricetin with Bovine Serum Albumin in the Presence of Zn<sup>2+</sup>

JIANG Xin-Yu<sup>1</sup> LI Wen-Xiu<sup>1</sup> CHEN Jing-Wen<sup>\*2</sup>

(<sup>1</sup>College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083)

(<sup>2</sup>School of Chemical and Biological Engineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng, Jiangsu 224051)

**Abstract:** The effect of Zn<sup>2+</sup> on the interactions between Quercetin (Que), Myricetin (Myr), two typical naturally occurring biologically-active molecules, and bovine serum albumin (BSA) was investigated by means of fluorescence, infrared and ultraviolet spectroscopic methods. The fluorescence intensity of BSA decreased remarkably upon addition of both Que and Myr, respectively, exhibiting that each compound binds to BSA in aqueous solution. When appropriate amount of Zn<sup>2+</sup> was added to the mixture of BSA and Que or Myr, the fluorescence of BSA decreased again accompanied by appreciable blue-shift of its maximum emission wavelength, among which the changes resulted by Myr are more noticeable than Que. The results indicate that Zn<sup>2+</sup> can exert some effects on the interactions of both Myr and Que with BSA, and the effects are related to the number of the hydroxyl in B ring of the molecule. The quantitative calculation shows that the binding constant and the number of binding sites of both compounds decreases in the presence of Zn<sup>2+</sup>. The infrared spectrum and ultraviolet spectra indicate that Zn<sup>2+</sup> binds to both Que and Myr, forming Zn<sup>2+</sup> complex, respectively. The effect of Zn<sup>2+</sup> on the interactions of Que, Myr with BSA in aqueous solution may be ascribed to the zinc complex formation. Increasing number of hydroxyl in B ring of the flavones-type compounds such as Que and Myr may increase their affinity to BSA. However, the presence of Zn<sup>2+</sup> may decrease their binding ability.

**Key words:** fluorescence spectroscopy; infrared spectroscopy; BSA; zinc(II); quercetin; myricetin

收稿日期: 2008-02-19。收修改稿日期: 2008-06-05。

江苏省高校自然科学基金基础研究项目(No.06KJB150120)、国家自然科学基金资助项目(No.20775092)。

\*通讯联系人。E-mail: jwchen@ycit.edu.cn, jiangxingyu@mail.csu.edu.cn; Tel: +86-515-88298130

第一作者: 蒋新宇, 男, 40 岁, 博士, 副教授; 研究方向: 天然药物分离及药理研究。

## 0 引言

药物与蛋白的相互作用对药物在体内的转运和代谢过程产生重要影响<sup>[1]</sup>。血清白蛋白是脊椎动物循环系统中主要的可溶性蛋白, 约占血浆蛋白的 50%<sup>[2]</sup>, 具有许多重要的生理功能, 如对血液中许多物质的存储、转运、分配和代谢等过程产生极其重要的影响<sup>[3,4]</sup>。通过对药物与血清蛋白的结合方式、结合力大小及结合位点等性质的研究, 可获得该药物在血液中的分布、药物浓度变化及药效等许多极具价值的信息<sup>[5]</sup>, 据此, 相关研究引起了人们的广泛关注。牛血清蛋白(BSA)与人血清蛋白(HSA)具有相似的序列和构象, 因此 BSA 成为研究药物与蛋白相互作用的最佳底物<sup>[6]</sup>。研究表明, BSA 上的酪氨酸和色氨酸残基是小分子药物结合的主要位点, 药物分子可通过范德华力、氢键或疏水作用力与 BSA 相结合<sup>[3,4]</sup>。因 BSA 能够产生源于酪氨酸残基和色氨酸残基的荧光, 利用药物小分子对 BSA 内源荧光的影响来研究药物与其相互作用的机理成为许多科研工作者采用的方法<sup>[7,8]</sup>。

槲皮素(Quercetin, 简称为 Que)和杨梅素(Myricetin, 简称为 Myr)是存在于多种植物中的多酚类黄酮类化合物(见图 1), 具有抗炎、抗癌、抗病毒及清除自由基等功效<sup>[9-11]</sup>。这类化合物与 BSA 的相互作用已有人进行了探索<sup>[12-14]</sup>, 但研究金属离子对其与 BSA 相互作用的报道极其少见。BSA 的氨基酸残

基能够提供配位原子氧和氮, 当体系中存在金属离子时, BSA 可通过氧和氮的配位作用与金属离子相结合。另一方面, 在 Que 和 Myr 分子中, A 环和 B 环的酚羟基也可与金属离子配位, 在一定条件下, C 环上的羰基也可能参与对金属离子的配位。可见, 金属离子的存在可能影响这两种药物分子与 BSA 的相互作用。 $Zn^{2+}$ 是人体中具有极其重要功能的生物离子。本文采用了荧光、紫外、红外等光谱方法考察了在水溶液中  $Zn^{2+}$  对 Que 和 Myr 与 BSA 相互作用的影响, 通过对比不同  $Zn^{2+}$  浓度下 Que、Myr 对 BSA 的荧光猝灭及它们的结合常数、结合位点数等参数, 揭示在  $Zn^{2+}$  存在下两种药物分子与 BSA 之间的作用规律, 为探索它们在体内的转运过程及其药物机理提供有价值的信息。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

FP-6500 型荧光光谱仪 (日本 Jasco 公司); UV-2450 型紫外分光光度计 (日本 Shimadzu 公司); NEXUS 670 傅立叶红外光谱仪, 配置 ATR 附件 (美国 Nicolet 公司); HX-1050 型恒温循环器 (北京博医康实验仪器有限公司); pH-3C 型精密 pH 计 (上海雷磁仪器厂)。

BSA (Sigma 公司, 第 V 组分, 分子量: 68 000) 溶液:  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 用下述 Tris 缓冲溶液配制; Que、Myr (北京国家药物及生物产品控制中心, 纯度 > 98%) 溶液:  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 分别用甲醇和水 ( $V/V=1:1$ ) 混合溶液配制; Tris-HCl 缓冲溶液:  $0.20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH=7.30, 含浓度为  $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaCl; 醋酸锌溶液:  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 用无水甲醇配制。醋酸锌、Tris、盐酸、氯化钠、甲醇均为分析纯试剂, 实验用水为二次蒸馏水。

### 1.2 实验方法

荧光光谱: 用微量注射器将一定量的 BSA 溶液、药物溶液和醋酸锌溶液分别注入 11 只 10 mL 容量瓶中, 用水定容后在 310 K 水浴中保温 1 h。设置电压为 430 V, 激发和发射通带分别为 3 nm 和 5 nm, 激发波长为 280 nm, 在 290~450 nm 区间内进行荧光光谱扫描, 记录 BSA 最大发射波长处所对应的荧光强度。

紫外、红外吸收光谱: 分别取不同体积的醋酸锌溶液 ( $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 加入到 3 mL Que 或 Myr ( $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 与 BSA ( $1.00 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的混合

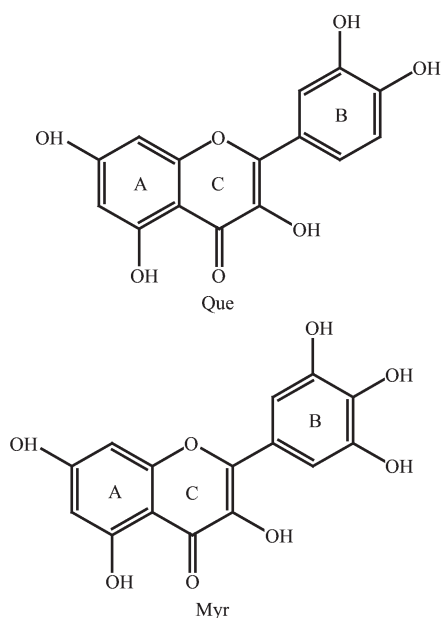


图 1 槲皮素和杨梅素的分子结构

Fig.1 Molecular structure of Que and Myr

溶液中,用 Tris 缓冲溶液定容至 10 mL,混合均匀,以试剂空白为参比测量其紫外光谱。同时移取适量上述溶液至红外光谱仪 ATR 附件的样品池中,以同浓度的 Tris 缓冲溶液为空白,扫描水溶液的红外吸收光谱。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $\text{Zn}^{2+}$ 存在下 Que 和 Myr 与 BSA 作用的红外光谱

对于蛋白质结构变化的分析,红外光谱是一种重要的手段,它能够提供蛋白质在水溶液中构型变化的重要信息<sup>[15]</sup>。BSA 在 1652 和 1538  $\text{cm}^{-1}$  附近具有 2 个特征峰<sup>[16]</sup>,前者为酰胺(amide I)C=O 的伸缩振动,而后者为酰胺(amide II) N-H 的弯曲振动。这两种酰胺键与蛋白的二级结构有密切关系,其中 amide I 波段的 1652  $\text{cm}^{-1}$  峰反映的是 BSA 的  $\alpha$ -螺旋构型<sup>[17]</sup>,当蛋白的结构发生变化时,amide I 的红外波段比 amide II 的变化更显著<sup>[18]</sup>。图 2 分别为 BSA、Que、Myr、Que+BSA、Myr+BSA 及 Que+BSA+ $\text{Zn}^{2+}$ 、Myr+BSA+ $\text{Zn}^{2+}$ 水溶液的傅里叶变换衰减全反射红外光谱(ATR-FTIR)。结果显示,当向 BSA 溶液

中加入一定量的 Que 和 Myr 时,BSA 的 amide I 波段 C=O 峰几乎消失;amide II 波段的 1538  $\text{cm}^{-1}$  峰也几乎完全消失,同时其高波数段吸收也均消失。相应地,Que 的 1613.42  $\text{cm}^{-1}$  移到 1616.04  $\text{cm}^{-1}$ ,而 Myr 的 1659.64 和 1328.97  $\text{cm}^{-1}$  分别移到 1656.46 和 1326.89  $\text{cm}^{-1}$ ,其中后者的强度显著减弱。该结果表明,在水溶液中 Que 和 Myr 分别与 BSA 发生了相互作用。当在上述两种药物与 BSA 的混合体系中分别加入一定量的  $\text{Zn}^{2+}$ 时,BSA 的上述 2 个特征吸收峰完全消失,同时,Que 的 C=O 特征吸收峰 1655.87  $\text{cm}^{-1}$  几乎消失,1613.42  $\text{cm}^{-1}$  移到 1608.93  $\text{cm}^{-1}$ ,1515.85  $\text{cm}^{-1}$  吸收明显减弱;Myr 的 1659.64  $\text{cm}^{-1}$  移到 1619.95  $\text{cm}^{-1}$ ,1328.97  $\text{cm}^{-1}$  几乎消失,1518.33  $\text{cm}^{-1}$  吸收移到 1522.87  $\text{cm}^{-1}$  并减弱。醋酸根离子的  $\nu_{\text{asym}}$ (1592  $\text{cm}^{-1}$ )被 Que 和 Myr 的苯环骨架振动吸收所掩盖,其  $\nu_{\text{sym}}$ (1404  $\text{cm}^{-1}$ )没有发生明显变化。BSA、Que、Myr 及  $\text{Zn}^{2+}$ 逐步混合后各溶液的主要特征吸收峰的变化情况见表 1。上述结果表明,在水溶液中  $\text{Zn}^{2+}$ 能够与 Que 和 Myr 发生结合,可能使其分子结构发生变化,从而影响了各药物与 BSA 的相互作用。

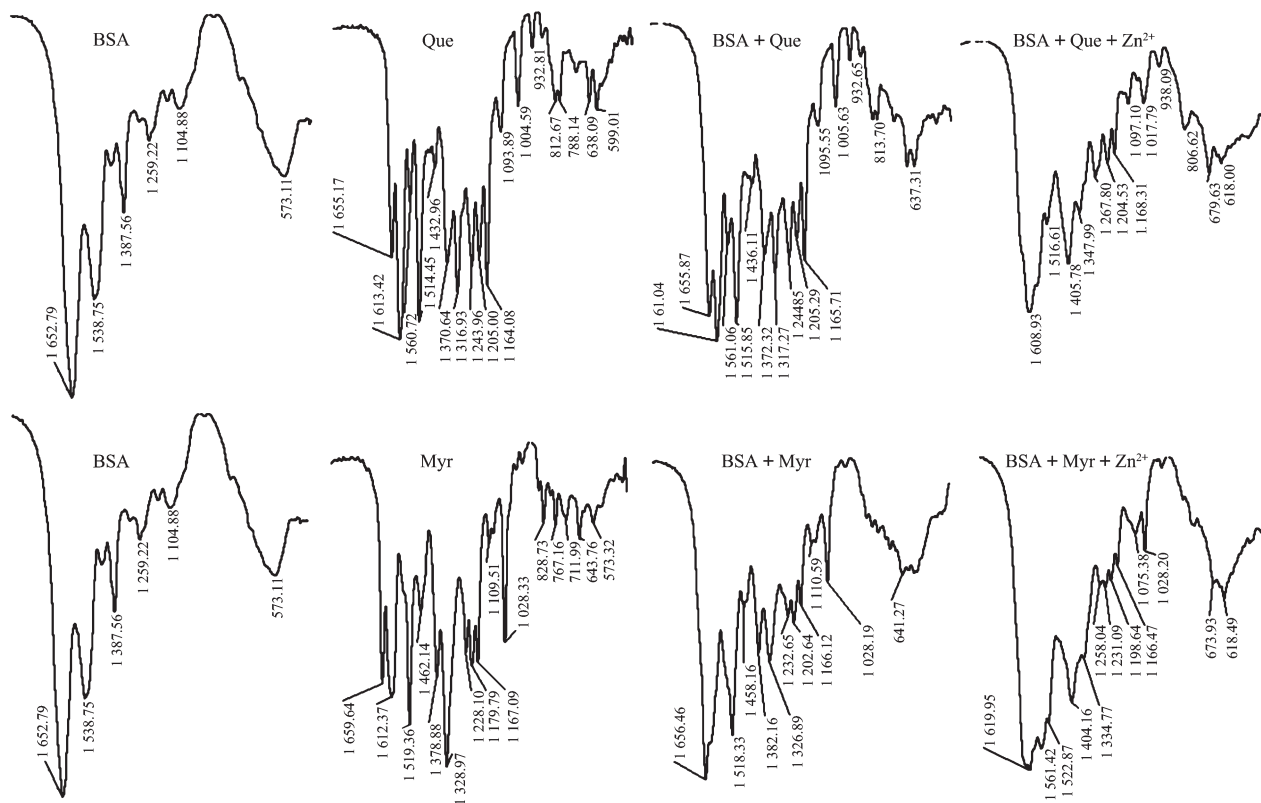


图 2 槲皮素、杨梅素及  $\text{Zn}^{2+}$ 存在下 BSA 水溶液的傅里叶变换衰减全反射红外光谱(ATR-FTIR)变化

Fig.2 ATR-FTIR spectra of aqueous Que, Myr and the mixture of each medicine and BSA in the presence of  $\text{Zn}^{2+}$

表 1 在槲皮素、杨梅素及  $\text{Zn}^{2+}$  作用下 BSA 衰减全反射特征红外吸收峰的变化  
Table 1 ATR-FTIR variations of aqueous BSA upon interaction with Que, Myr and  $\text{Zn}^{2+}$

|                                 | BSA / $\text{cm}^{-1}$ |                    | Que / $\text{cm}^{-1}$ |                    | Myr / $\text{cm}^{-1}$ |                       |
|---------------------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|-----------------------|
|                                 | 1 652                  | 1 538              | 1 613.42               | 1 655.87           | 1 659.64               | 1 328.97              |
| BSA+flavonols                   | Almost disappeared     | Almost disappeared | 1 616.04               | No change          | 1 656.46               | 1 326.89 and weakened |
| BSA+flavonols+ $\text{Zn}^{2+}$ | All disappeared        | All disappeared    | 1 608.93               | Almost disappeared | 1 619.95               | Almost disappeared    |

## 2.2 $\text{Zn}^{2+}$ 存在下 Que 和 Myr 与 BSA 作用的荧光光谱

为定量研究  $\text{Zn}^{2+}$  对 Que 或 Myr 与 BSA 相互作用的影响, 利用荧光光谱法研究了每种药物在水溶液中与 BSA 的结合。当用 280 nm 光激发, BSA 在 341 nm 左右产生较强的荧光, 而在同一条件下, Que 和 Myr 不产生荧光。图 3 与图 4 中的第 1 张图分别为不存在  $\text{Zn}^{2+}$  时 BSA 的荧光光谱随 Que 和 Myr 浓度变化的情况。结果表明, 随着 Que、Myr 浓度的增加, BSA 的荧光强度均逐渐降低, 其最大发射波长分别从 341 nm 移至 340 nm 和 339 nm, 其中, Myr 导致 BSA 的特征发射波长产生蓝移的程度比 Que 大。上述变化表明, Que 和 Myr 均与 BSA 发生了结合, 可能使 BSA 的构象发生了改变, 导致 BSA 上的色氨酸残基所处的微环境的极性降低、疏水性

增强<sup>[9]</sup>。图 3 和图 4 的后 3 张图为不同浓度  $\text{Zn}^{2+}$  及相应浓度  $\text{Zn}^{2+}$  存在下分别改变 Que、Myr 浓度时 BSA 荧光的变化。结果表明, 不同浓度的  $\text{Zn}^{2+}$  也能够使 BSA 的荧光发生淬灭, 随着  $c_{\text{Zn}^{2+}}$  的增大, BSA 的特征发射波长同时发生了显著的蓝移。当  $c_{\text{Zn}^{2+}} \leq 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, BSA 的荧光强度降低, 但其特征发射波长几乎不发生变化; 但当  $c_{\text{Zn}^{2+}} > 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, BSA 的荧光淬灭和蓝移效果显著增强。在含定量  $\text{Zn}^{2+}$  的 BSA 溶液中分别加入 Que 和 Myr 时, BSA 的荧光强度随其浓度的增大而进一步降低, 同时进一步产生了少许蓝移, 其中, Myr 对 BSA 荧光的淬灭效果较同浓度的 Que 显著。在含定量  $\text{Zn}^{2+}$  ( $1, 10, 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 BSA ( $1.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 溶液中分别加入不同浓度的 Que 或 Myr 所形成的各混合溶液在 331 nm 处的荧

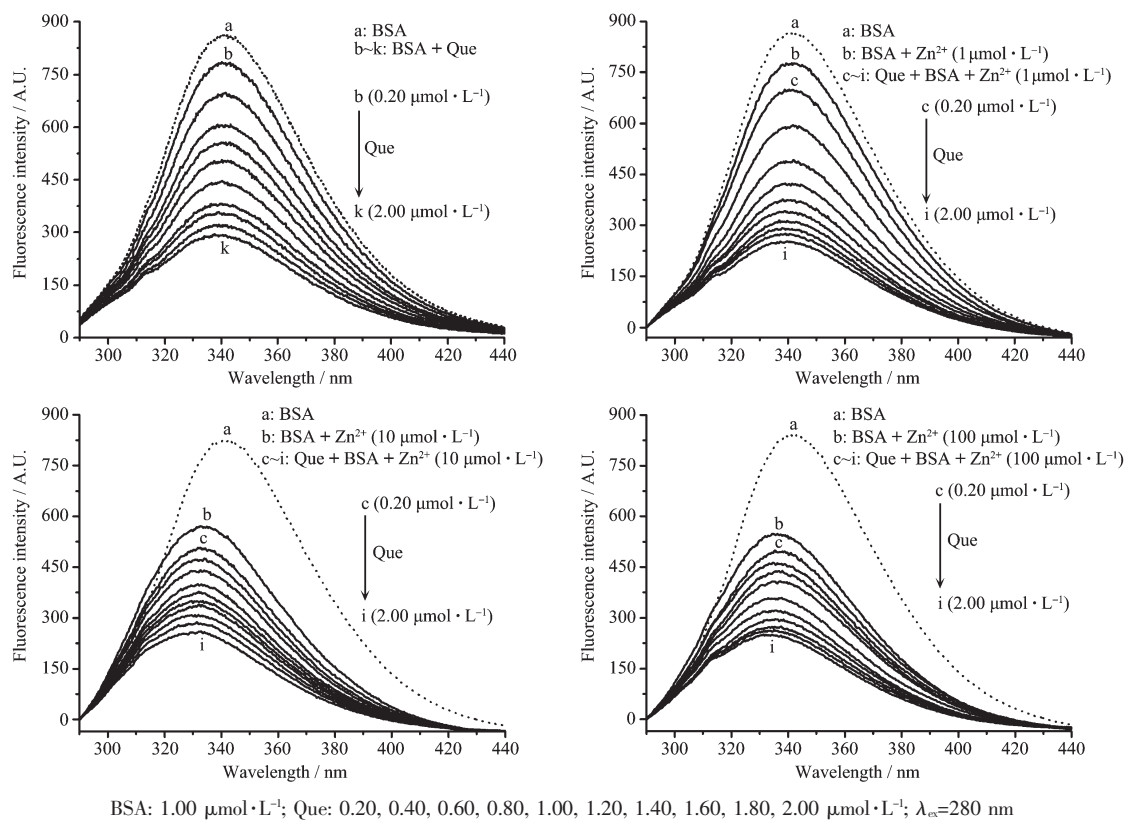


图 3 定量  $\text{Zn}^{2+}$  存在下槲皮素对 BSA 的荧光光谱的影响

Fig.3 Effect of Que on the fluorescence of BSA in the presence of certain amount of  $\text{Zn}^{2+}$

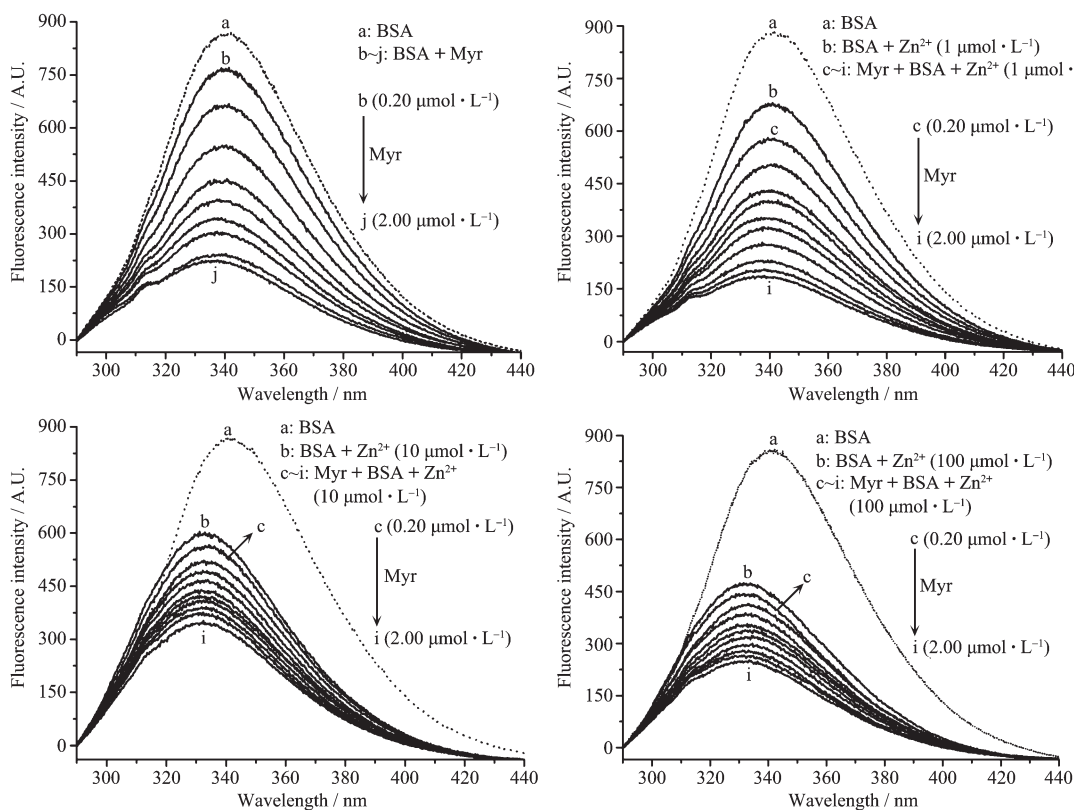


光强度( $F$ )相对于同浓度 BSA 在同一发射波长处的荧光强度( $F_0$ )对各药物浓度作图,见图 5。

上述结果显示,在水溶液中,Que 和 Myr 均能淬灭 BSA 的内源荧光,表明他们均能与 BSA 发生结合。 $Zn^{2+}$ 同样能够导致 BSA 的荧光淬灭,当向含定量  $Zn^{2+}$  的 BSA 溶液中分别加入一定量的 Que 或 Myr 时,BSA 的荧光淬灭和蓝移效果更加显著,可

见, $Zn^{2+}$ 的存在对 Que 和 Myr 与 BSA 的结合产生显著的影响,可能导致 BSA 肽链进一步卷曲折叠,使其内部的疏水结构加强,从而增强了色氨酸残基周围的疏水性。

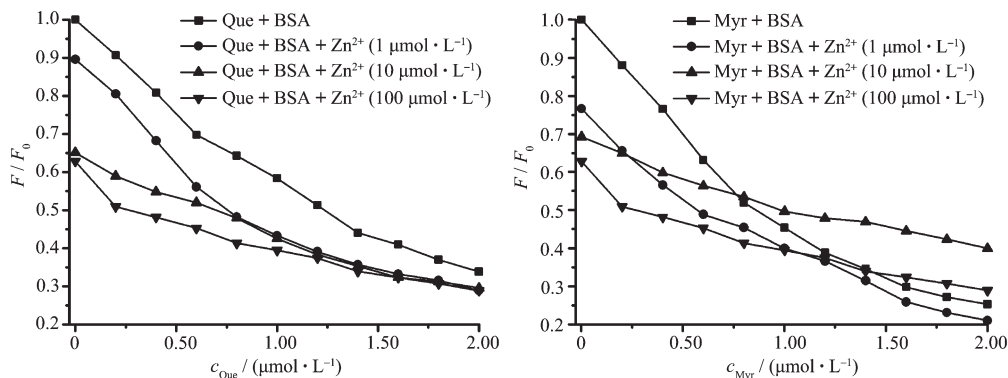
应用文献报道的 Stern-Volmer 方程  $F_0/F=1+K_q\tau_0C_Q=1+K_{sv}C_Q^{[20]}$  及关系式  $\lg[(F_0-F)/F]=\lg K_a+n\lg C_Q^{[21]}$  对  $Zn^{2+}$  存在下 Que 和 Myr 与 BSA 结合的结合常数



BSA:  $1.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Myr: 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00, 1.20, 1.40, 1.60, 1.80, 2.00  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}}=280 \text{ nm}$

图 4 定量  $Zn^{2+}$  存在下杨梅素对 BSA 的荧光光谱的影响

Fig.4 Effect of Myr on the fluorescence of BSA in the presence of certain amount of  $Zn^{2+}$



Conditions are the same as those in Fig.3 and 4

图 5 定量  $Zn^{2+}$  存在时槲皮素和杨梅素引起的 BSA 荧光变化相对值( $F/F_0$ )与 Que 和 Myr 浓度的关系

Fig.5 Relationship between the relative change of BSA fluorescence resulted by both Que or Myr and the concentration of Que or Myr in the presence of quantitative  $Zn^{2+}$

及结合位点数及 BSA 荧光淬灭速率常数等参数进行定量计算。首先假设 Que 和 Myr 与 BSA 结合为动态结合模式, 根据 Stern-Volmer 方程计算可得 Que 和 Myr 与 BSA 结合的动态淬灭速率常数分别为  $1.04 \times 10^{14} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  和  $1.64 \times 10^{14} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 该值远远大于研究所得的动态扩散控制的荧光淬灭

速率常数的最大值  $6.0 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  [22], 由此可推测, 在  $\text{Zn}^{2+}$  存在下 Que 和 Myr 对 BSA 的荧光淬灭过程均为静态作用模式。

利用静态淬灭关系式 [21] 计算在不同浓度  $\text{Zn}^{2+}$  存在下 Que 和 Myr 分别与 BSA 的结合常数 ( $K_a$ ) 和结合位点数 ( $n$ ), 结果见表 2。

表 2 310 K 下不同浓度  $\text{Zn}^{2+}$  存在下槲皮素、杨梅素与 BSA 的结合常数及结合位点数

Table 2 Binding constants ( $K_a$ ) and number of binding sites ( $n$ ) for both Que and Myr with BSA in the presence of different concentration of  $\text{Zn}^{2+}$  at 310 K

|                                                                  |     | Concentration of $\text{Zn}^{2+}$ / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) |                    |                    |                    |
|------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                                                                  |     | 0                                                                           | 1                  | 10                 | 100                |
| $K_a$ / ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) | Que | $3.70 \times 10^7$                                                          | $3.11 \times 10^7$ | $2.99 \times 10^6$ | $3.31 \times 10^5$ |
|                                                                  | Myr | $2.15 \times 10^8$                                                          | $1.29 \times 10^7$ | $3.73 \times 10^5$ | $1.56 \times 10^4$ |
| $n$                                                              | Que | 1.28                                                                        | 1.25               | 1.12               | 0.96               |
|                                                                  | Myr | 1.38                                                                        | 1.18               | 1.00               | 0.73               |

图 5 及表 2 结果表明,  $\text{Zn}^{2+}$  对 Que 和 Myr 与 BSA 结合的影响效果是相似的, 随着  $\text{Zn}^{2+}$  浓度的增大, 两种药物与 BSA 的结合常数和结合位点数均显著降低。这可能由以下两个原因所导致: (1)  $\text{Zn}^{2+}$  能够与 BSA 的氨基酸残基发生结合, 部分占据了 Que 和 Myr 与 BSA 原来结合的位点; (2) Que 和 Myr 充当了  $\text{Zn}^{2+}$  的配体, 与  $\text{Zn}^{2+}$  发生结合, 生成了各自的锌配合物, 所形成的配合物具有不同于 Que 和 Myr 所拥有的分子构型、体积、刚性、亲水-疏水性等性质, 使其难以进入 BSA 的疏水腔而与色氨酸残基结合, 从而导致了与 BSA 的结合常数、结合位点数变小。

同时还可以看出, Myr 与 BSA 的结合常数大于 Que,  $\text{Zn}^{2+}$  对 Myr 的影响效果明显大于 Que。Que 和 Myr 属于同系物, 仅在 B 环上相差 1 个羟基, 但 Myr 所增加的这个羟基显著地增强了其与 BSA 分子中氨基酸残基的结合能力, 同时也增强了与  $\text{Zn}^{2+}$  的配

位能力, 使其与 BSA 的结合性质与 Que 产生了差异。由此可以推断, 在  $\text{Zn}^{2+}$  存在下, Que、Myr 等黄酮醇类药物 B 环羟基数的增加能够使药物与 BSA 的结合能力增强, 而  $\text{Zn}^{2+}$  的存在反而使其结合能力减弱。

### 2.3 水溶液中 $\text{Zn}^{2+}$ 与 Que 和 Myr 的结合

上述结果表明, 在水溶液中  $\text{Zn}^{2+}$  能够显著影响 Que 和 Myr 与 BSA 的结合。为探明在这两种药物与 BSA 的作用过程中  $\text{Zn}^{2+}$  仅仅发挥了协同作用还是分别与各药物形成了新的配合物而产生的影响, 采用紫外和红外吸收光谱法进一步探索了在同一条件下  $\text{Zn}^{2+}$  分别与 Que 和 Myr 的结合。Que 和 Myr 在紫外区均有 2 个吸收带: 375 nm 和 256 nm, 前者是由黄酮母核上的桂皮酰基的电子跃迁引起的吸收; 后者是由黄酮母核上的苯甲酰基的电子跃迁引起的吸收 [10]。A 环上的羟基氧取代可同时引起 2 个吸收带的红移。从图 6 可以看出,  $\text{Zn}^{2+}$  的加入使 2 个紫

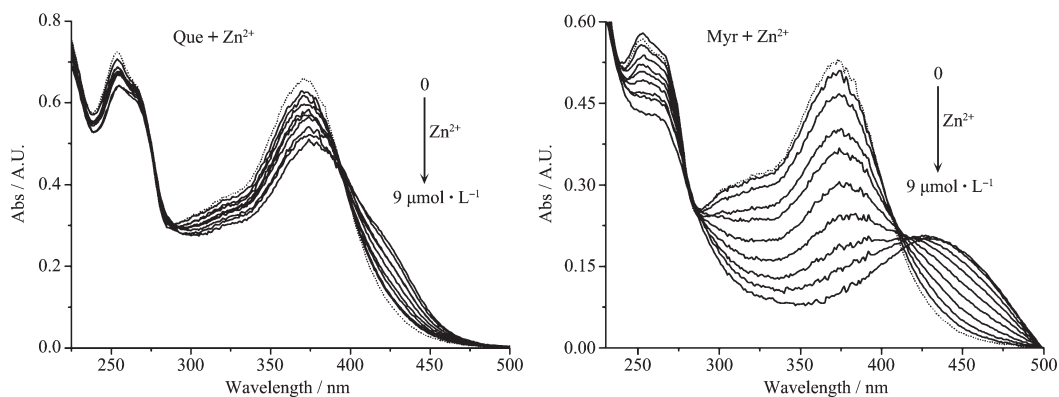


图 6  $\text{Zn}^{2+}$  存在下槲皮素和杨梅素的紫外光谱变化

Fig.6 Variation of the ultraviolet spectra of Que ( $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and Myr ( $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) with increasing  $\text{Zn}^{2+}$

外吸收带都发生了不同程度的红移,光谱形状也发生了较大的变化,其中  $\text{Zn}^{2+}$  对 Myr 紫外吸收光谱的影响比 Que 显著得多。随着  $\text{Zn}^{2+}$  浓度的增大,Que 在 263 nm 和 393 nm 出现了 2 个等吸收点,而 Myr 在 282 nm 和 418 nm 处出现了 2 个等吸收点。该结果表明,在水溶液中,  $\text{Zn}^{2+}$  与 Que 和 Myr 分别发生了结合,形成了各自的 Que-Zn(II) 和 Myr-Zn(II) 配合物。

进一步研究了在水溶液中  $\text{Zn}^{2+}$  对 Que 和 Myr 红外光谱的影响。如图 7 所示并对比图 2 第 2、3 张图可以看出,当分别向 Que 和 Myr 的水溶液中加入

一定量的  $\text{Zn}^{2+}$  时,各药物分子中的 C=O 振动吸收消失,同时,酚羟基的 C-O 振动吸收发生减弱或消失。该结果表明,Que 和 Myr 的 C 环上的羰基与  $\text{Zn}^{2+}$  发生了配位, B 环上的酚羟基也参与了与  $\text{Zn}^{2+}$  的结合,可能形成了各自的锌配合物。

上述结果表明,在水溶液中,  $\text{Zn}^{2+}$  可与 Que 和 Myr 分别结合,形成了新的锌配合物,  $\text{Zn}^{2+}$  对 Que 和 Myr 与 BSA 相互作用的影响在很大程度上是通过所形成的锌配合物与 BSA 发生了结合,但尚不能排除溶液中游离  $\text{Zn}^{2+}$  的与 Que 和 Myr 的协同作用。

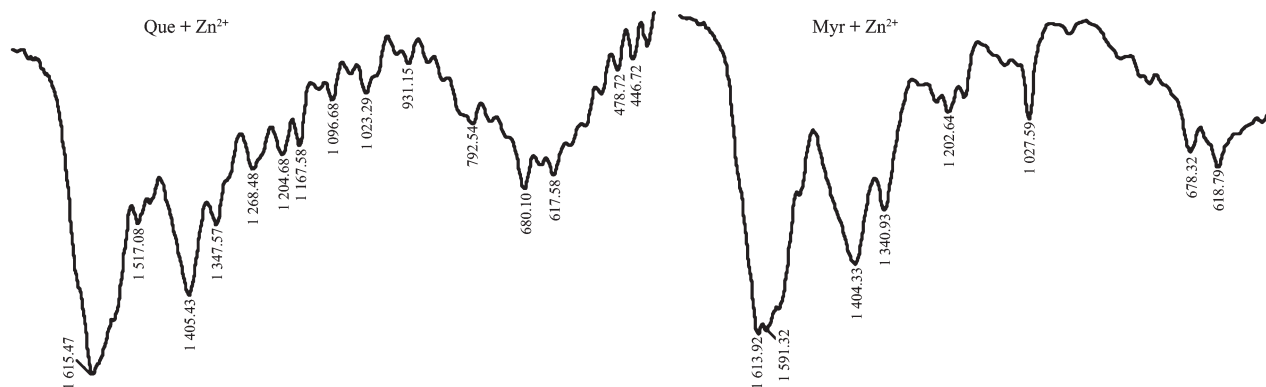


图 7  $\text{Zn}^{2+}$  存在下槲皮素和杨梅素的傅里叶变换衰减全反射红外光谱变化

Fig.7 ATR-FTIR spectra of Que and Myr in the presence of  $\text{Zn}^{2+}$

### 3 结 论

槲皮素(Que)和杨梅素(Myrr)是存在于多种植物中的多羟基黄酮类化合物,具有抗炎、抗癌、抗病毒及清除自由基等药物功效。 $\text{Zn}^{2+}$  是存在于人体中的重要生物离子,考察在  $\text{Zn}^{2+}$  存在下 Que 和 Myr 与血清蛋白的作用对进一步研究黄酮类化合物的药理和药效具有重要意义。本文采用荧光、紫外、红外等多种光谱方法研究了在水溶液中  $\text{Zn}^{2+}$  对 Que、Myr 与牛血清蛋白 (BSA) 相互作用的影响。结果表明,Que 和 Myr 均能使 BSA 的荧光发生淬灭,  $\text{Zn}^{2+}$  的加入则进一步导致了 BSA 的荧光淬灭,同时,BSA 的发射光谱发生了显著的蓝移现象,其中  $\text{Zn}^{2+}$  对 Myr 的影响甚于 Que,说明在  $\text{Zn}^{2+}$  存在下,BSA 的构型进一步发生了变化。定量计算表明,加入  $\text{Zn}^{2+}$  后两种药物与 BSA 间的结合常数显著降低、结合位点减小,表明在同一金属离子存在下 Que 和 Myr 等多羟基黄酮类化合物分子结构中 B 环上的羟基数与其与血清蛋白的结合能力有密切关系。进一步研究显示,  $\text{Zn}^{2+}$  与 Que、Myr 发生了配位反应,形成了新的配合物。可以推断,在  $\text{Zn}^{2+}$  存在下,槲皮素和杨梅素与

BSA 的结合在很大程度上分别是两种药物的锌配合物与其作用的结果。

### 参考文献:

- [1] Roufik S, Gauthier S F, Leng X, et al. *Biomacromolecules*, **2006**,**7**:419~426
- [2] He X M, Carter D C. *Nature*, **1992**,**358**:209~215
- [3] Carter D C, He X M. *Science*, **1990**,**249**:302~303
- [4] Kumar C V, Buranaprapuk A, Opitck G J, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1998**,**95**:10361~10366
- [5] Xiao J B, Shi J, Cao H, et al. *J. Pharmaceut. Biomed.*, **2007**, **45**:609~615
- [6] Peters T Jr. *Adv. Protein Chem.*, **1985**,**37**:161~245
- [7] Xiao J B, Suzuki M, Jiang X Y. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, **56**:2350~2356
- [8] Swati D, Agnishwar G, Susmita D. *J. Colloid Interface Sci.*, **2005**,**285**:562~573
- [9] Wang S F, Cheng Y Y. *J. Pharmaceut. Biomed.*, **2006**,**40**: 1137~1142
- [10] Lu J, Papp L V, Fang J G. *Cancer Res.*, **2006**,**66**:4410~4418
- [11] Kwon O, Eck P, Chen S L. *FASEB J.*, **2007**,**21**:366~377

- [12]LIAO Wei-Ping(廖卫平). *Thesis for the Doctorate of Shandong University*(山东大学博士论文). **2007**.
- [13]Kim D, Park J, Kim J, et al. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**,**54**: 935~941
- [14]Soares S, Mateus N, Freitas V. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, **55**:6726~6735
- [15]Timasheff S N, Susi H, Stevevs L. *J. Biol. Chem.*, **1967**,**242**: 5467~5473
- [16]Renugopalakrishnan V, Chandrakasan G, Moore S, et al. *Macromolecules*, **1989**,**22**:4121~4124
- [17]Susi H, Timasheff S N, Stevens L. *J. Biol. Chem.*, **1967**,**443**: 5460~5466
- [18]Rahmelow K, Hubner W. *Anal. Biochem.*, **1996**,**241**:5~13
- [19]YANG Mei-Ling(杨美玲), YANG Pei-Ju(杨培菊), SONG Yu-Min(宋玉民). *Chinese J. Inorg. Chem.(Wuji Huaxue Xuebao)*, **2005**,**21**(4):483~489
- [20]Lakowicz J R, Weber G. *Biochemistry*, **1973**,**12**:4161~4170
- [21]Hu Y J, Liu Y, Wang J B, et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2004**,**36**:915~919
- [22]Ware W R. *J. Phys. Chem.*, **1962**,**66**:455~458