

咖啡酸及其衍生物光谱特性研究

张立伟, 袁彩霞, 杨 频*

山西大学分子科学研究所, 山西 太原 030006

摘 要 研究了不同 pH 值条件下,咖啡酸类化合物溶液的荧光及紫外光谱特性。实验结果表明:咖啡酸类化合物有很宽的 pH 发光范围(2~12),发光强度、光谱形状及峰位随 pH 值不同而异,且在 pH=9~10 时,咖啡酸类化合物荧光强度最强。研究还发现:咖啡酸类化合物 4-位酚羟基的解离可导致荧光强度显著增强,而 3-位酚羟基的解离可能会导致荧光猝灭,并且在强酸和强碱介质中发射荧光均被显著猝灭;此外,在强碱性介质中紫外光谱形状有很大变化,表明咖啡酸类化合物在强碱性下分子结构发生了明显改变。

主题词 咖啡酸;氯原酸;连翘酯甙;荧光光谱;紫外光谱

中图分类号: O657.31

文献标识码: A

文章编号: 1000-0593(2003)01-0127-04

引 言

咖啡酸(Caffeic acid)、氯原酸(Chlorogenic acid)、连翘酯甙(Forsythiaside)均为中草药的活性成分,咖啡酸、氯原酸具有广泛的抗菌作用,还有止血、增高白血球及抗病毒作用^[1],连翘酯甙对金黄色葡萄球菌等十一种致病菌均有极强的抑制作用^[2,3],并且具有抑制磷酸二酯酶及抗真菌作用。近年来关于咖啡酸、氯原酸、连翘酯甙的分离、提取、分析、药效及药理研究已有不少报道,但运用光谱手段研究它们的发光特性以及发光特性与分子结构之间的关系,却未见文献报道。本文详尽考察了咖啡酸、氯原酸、连翘酯甙在不同 pH 值下光谱特性及其光谱特性与分子结构间的关系,为咖啡酸、氯原酸、连翘酯甙的提取、分离、分析及药效的改进提供了新的化学理论基础。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

UV-365 型紫外-可见光谱仪, Model 850 型荧光光谱仪。

咖啡酸:Sigma 试剂,氯原酸:Fluka 试剂,连翘酯甙:本研究室提取,其他试剂均为分析纯。

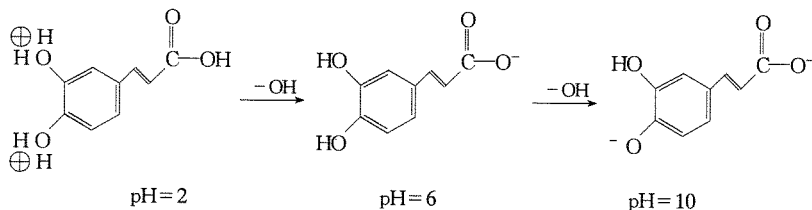
1.2 实验方法

咖啡酸、氯原酸、连翘酯甙分别用 pH=7 的三酸缓冲液配成 $1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液。分别测定时,用三酸缓冲液稀释定容在 5 mL 的容量瓶中,使其最终浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,用氢氧化钠调 pH 值。分别配制 pH=2~12 的系列溶液,平衡 12 h 后进行紫外和荧光测定。

2 结果与分析

2.1 pH 对咖啡酸类化合物紫外光谱的影响

通过对咖啡酸、氯原酸、连翘酯甙溶液在不同 pH 下的紫外光谱考察,发现三者的紫外光谱形状类似,但随 pH 变化时紫外光谱最大吸收峰的移动略有不同。在 pH 值从 2.05 逐渐增至 6.77 时,随 pH 值的增大,咖啡酸的紫外最大吸收峰逐渐紫移(图 1 吸收曲线 1~3),而氯原酸和连翘酯甙的紫外最大吸收峰逐渐红移(图 2 吸收曲线 1~4)。其原因可能是咖啡酸溶液随着 pH 的增大,咖啡酸分子羧基电离程度增大,分子结构中产生了交叉共轭效应,此效应对 π 电子共轭体系的影响大于酚羟基去质子化作用对 π 电子共轭体系的影响,这样就使体系的偶极矩减小,从而分子共轭程度减小,紫外光谱发生紫移。反应过程如下式:



收稿日期:2001-12-16, 修订日期:2002-05-28

基金项目:山西省自然科学基金及太原市启明星基金

作者简介:张立伟,1963年生,硕士,山西大学副教授 * 通讯联系人

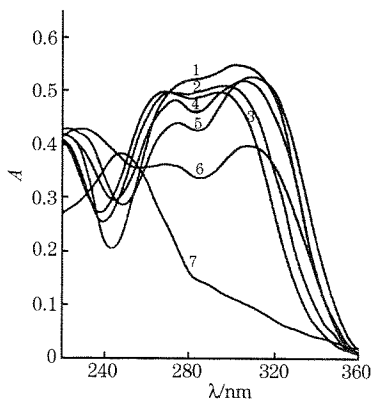


Fig. 1 The variations of absorption spectra of caffeic acid with pH

pH: 1: 2.05, 2: 5.49, 3: 6.77, 4: 7.19, 5: 9.69, 6: 10.54, 7: 12.0
 $c: 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

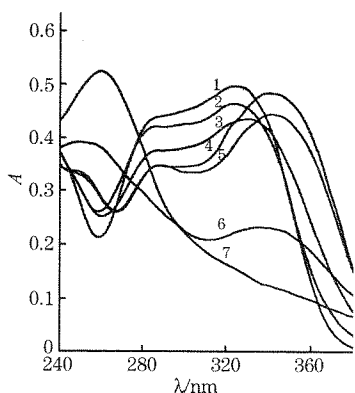
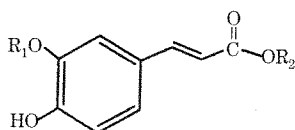
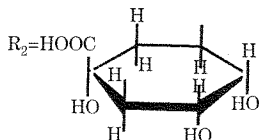


Fig. 2 The variations of absorption spectra of forsythiaside with pH

pH: 1: 2.05, 2: 5.49, 3: 6.77, 4: 7.19, 5: 9.69, 6: 10.54, 7: 12.0
 $c: 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

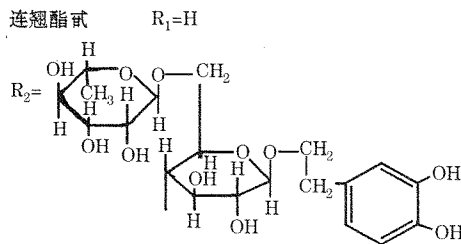


氯原酸 $R_1 = \text{H}$



$R_2 = \text{HOOC}$

咖啡酸 $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{H}$
 阿魏酸 $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{H}$



连翘酯甙 $R_1 = \text{H}$

$R_2 =$

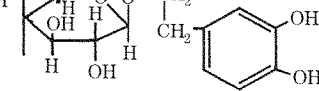


Fig. 3 Structure of caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid and forsythiaside

Table 1. The variations of fluorescence emission wavelength of caffeic acid, chlorogenic acid and forsythiaside with pH

pH	2.05	3.07	4.50	5.49	6.77	7.19	8.54	9.69	10.5	11.0	12.0
咖啡酸 λ_{em}/nm	465	464	445	472	476	476	478	480	476	472	472
氯原酸 λ_{em}/nm	463	465	466	489	500	503	508	500	494	486	486
连翘酯甙 λ_{em}/nm	360	463	467	507	510	512	513	497	480	482	482
阿魏酸 λ_{em}/nm	467	464	454	438	438	438	446	480	480	480	480

而氯原酸和连翘酯甙(结构见图 3)在此 pH 值范围内不会产生交叉共轭,仅可使酚羟基去质子化,且促进 $p-\pi$ 共轭效应增强,因而共轭体系能量降低,紫外光谱发生红移。在同样的实验条件下,我们进一步考查了与咖啡酸分子结构非常相似阿魏酸(Ferulic acid)的紫外光谱变化情况,发现阿魏酸与咖啡酸紫外光谱变化趋势一致。由此可以认为:在 $\text{pH} < 6$ 时,随 pH 值的增大,咖啡酸的紫外最大吸收峰逐渐紫移是由于分子结构中产生了交叉共轭效应。在 $\text{pH} = 6 \sim 10$ 时,随 pH 增大,咖啡酸、氯原酸和连翘酯甙的紫外光谱峰均红移(图 1 吸收曲线 4~5,图 2 吸收曲线 4~6),其原因可能是随着溶液中 OH^- 浓度的增大,酚羟基质子渐渐解离,致使体系的共轭程度有所增大,表现在紫外光谱上就是吸收峰发生红移。此外,在 $\text{pH} = 11 \sim 12$ 时,三者的紫外光谱形状均发生较大变化,350 nm 处峰逐渐消失,而在 250 nm 处出现新峰(图 1 吸收曲线 7,图 2 吸收曲线 7)。此时,向体系中滴加酸至中性,紫外光谱图形未能恢复,表明在强碱性条件下,体系的分子结构发生了明显变化。而在相同条件下,阿魏酸的紫外光谱图形未发生明显变化,仅有峰位的移动,且加酸可使紫外光谱位移变化得到恢复。上述结果表明:上述三个化合物结构中,由于邻二酚羟基的存在,在强碱性条件下结构不稳定,共轭 π 键可能遭到破坏。

2.2 pH 值对咖啡酸类化合物荧光光谱的影响

咖啡酸、氯原酸、连翘酯甙溶液在不同 pH 下的最大荧光发射波长数据表明(表 1):在酸性介质中($\text{pH} < 6$),以 350 nm 作为激发波长,咖啡酸的荧光发射峰先紫移后红移,氯原酸和连翘酯甙的荧光发射峰逐渐红移,变化规律与紫外光谱基本一致;在 $\text{pH} = 6 \sim 10$ 范围内,以 355 nm 为激发波长,咖啡酸、氯原酸和连翘酯甙的荧光发射峰均发生红移;而当 $\text{pH} > 10$ 时,三种化合物的荧光发射峰又均发生紫移,表明共轭体系共轭程度遭到破坏,而在相同条件下,阿魏酸的荧光发射峰未发生紫移,说明在强碱性条件下,阿魏酸共轭 π 键结构未遭到破坏。

2.3 pH 对咖啡酸类化合物荧光强度的影响

从咖啡酸、氯原酸、连翘酯甙溶液在不同 pH 值的荧光图谱(图 4 和图 5)可见,在总的趋势上,三者荧光强度变化规律是一致的。在强酸性条件下($\text{pH}=2\sim 4$),三者的荧光强度均很小(图 4 曲线 1,图 5 曲线 1,2),这可能是由于在强酸性介质中邻二酚羟基易发生质子化作用,使荧光强度下降。随着 pH 值的不断增大,三者的荧光强度呈不断上升趋势(图 4 曲线 2~5,图 5 曲线 3~6)。在 $\text{pH} 2\sim 7$ 区间,荧光强度增强主要是由于 H^+ 的猝灭效应被消除,以及由于体系的碱性增强,邻二酚羟基质子化作用减弱, $p-\pi$ 共轭效应增强。在 $\text{pH} 7\sim 10$ 区间,荧光强度随碱性提高而被加强,可能是由于酚羟基解离形成羟基负离子而引起的。据报道^[4]邻羟基肉桂酸的羧基和酚羟基上质子以完全解离的状态存在时,荧光强度较未解离的状态显著加强。据此,我们推测对位羟基肉桂酸的羧基和酚羟基上质子以完全解离的状态存在,荧光强度也应被显著加强。为了验证这一判断,我们又对阿魏酸进行了研究,结果表明:在 $\text{pH} 7\sim 10$ 区间,阿魏酸荧光强度的确随着 pH 值的不断提高而增强。对于上述三种化合物,由于对位酚羟基较间位酚羟基具有较高的酸性,随着 pH 值的不断提高,首先解离的质子应是对位的酚羟基质子,因此,在 $\text{pH} 7\sim 10$ 区间,荧光强度随碱性增大而被加强,主要是由于对位酚羟基解离形成羟基负离子而引起的。此外,在 $\text{pH}=10$ 附近,由于对

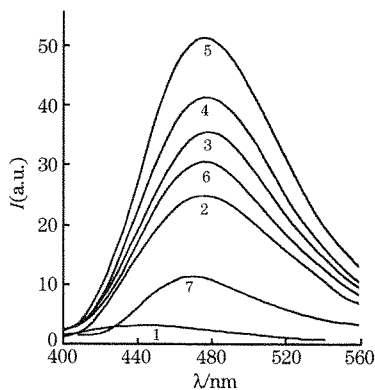


Fig. 4 Fluorescence spectra of caffeic acid with the variance of pH

pH: 1: 4.50, 2: 5.45, 3: 7.19, 4: 8.54, 5: 9.69, 6: 10.5, 7: 12.0
 $c: 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

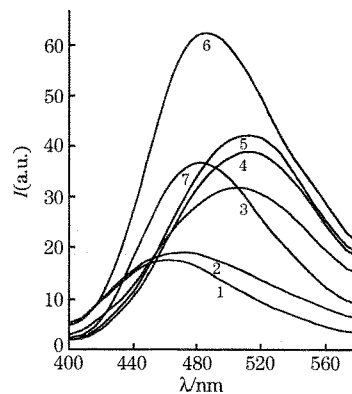


Fig. 5 Fluorescence spectra of forsythiaside with the variance of pH

pH: 1: 2.05, 2: 4.50, 3: 5.49, 4: 6.77, 5: 8.54, 6: 9.69, 7: 12.0
 $c: 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

位羟基上的质子已完全解离,因而所有体系的荧光强度呈现最强。从阿魏酸荧光强度的分析可知,在 $\text{pH} \approx 10$ 时该体系的荧光强度呈现最强,且随 pH 增大荧光强度几乎不变,这表明该体系中羧基及其对位羟基上的氢完全解离时荧光最强。继续增大 pH 值,咖啡酸、氯原酸、连翘酯甙体系的荧光强度逐渐下降(图 4 曲线 6,7,图 5 曲线 7),当 $\text{pH}=10\sim 12$ 时,体系的荧光被显著猝灭。导致体系荧光猝灭的原因可能有两个方面,第一,由于间位酚羟基与邻对位酚羟基形成氧负离子形式时对共轭体系的影响不同,因此,随 pH 值的进一步增大,间位酚羟基上质子的解离可能会使体系的荧光猝灭;第二方面,体系的荧光猝灭是由于在强碱的条件下,体系的分子结构发生了明显变化。

3 结 论

由上述实验结果可以得出以下明显结论:①咖啡酸、氯原酸、连翘酯甙具有较宽的荧光发光范围($\text{pH}=2\sim 10$),且在 $\text{pH}=9\sim 10$ 区间发射荧光最强;②对于咖啡酸、氯原酸、连翘酯甙,对位酚羟基的解离可导致荧光强度显著增强,而间位酚羟基的解离可能会导致荧光猝灭;③紫外吸收光谱和荧光光谱研究表明:在强碱性条件 $\text{pH}=11\sim 12$ 下,上述化合物结构可能会发生质的变化,提示在它们进行提取、结构改造等方面研究时,要避免长时间使用强碱。

参 考 文 献

- 1 国家医药管理局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册, 北京: 人民卫生出版社, 1986, 159, 209.
- 2 Katsuya Endo, Hiroshi Hikino. *Heterocycles*, 1982, 19(1):2033.
- 3 Sansei, et al. *Chem. Pharm. Bull.*, 1982, 32(12):4548.
- 4 Udenfriend S. *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*, New York: Academic Press, 1962, 28.

Study on the Spectral Properties of Caffeic Acid and Its Derivatives

ZHANG Li-wei, YUAN Cai-xia and YANG Pin

Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract Caffeic acid, chlorogenic acid and forsythiaside are active components of Chinese herbs and have diverse biological activities. As the similar compounds, they all include 3, 4-dihydroxy-phenyl in their structures. In this paper, the fluorescence and UV spectra of the caffeic acid, chlorogenic acid and forsythiaside were studied in different pH. The spectra properties of fluorescence and UV were further discussed in view of the phenol hydroxyl states, free, dissociative and protonated. It is found that the luminescence intensity, the peak shape and peak wavelength change with pH. Experimental results also indicate that caffeic acid, chlorogenic acid and forsythiaside can emit fluorescence in wide range of pH (2—12), and fluorescent intensity is enhanced as the dissociation of 4-phenol hydroxyl. On the other hand, fluorescent intensity may be quenched as the dissociation of 3-phenol hydroxyl. Furthermore, in strong acidic or in strong basic media, the fluorescence is quenched partly, and the shape of UV spectra changed greatly in strong basic media, meaning that their molecular structures are changed considerable.

Keywords Caffeic acid; Chlorogenic acid; Forsythiaside; Fluorescence spectrum; UV

(Received Dec. 16, 2001; accepted May 28, 2002)