

包裹 BSA 的线状银为基底探讨小檗碱的拉曼光谱^①

张彩红, 周光明, 程洪梅, 李俊平

西南大学 化学化工学院, 重庆 400715

摘要: 通过拉曼光谱技术测定了液体小檗碱(Berberine)的常规拉曼光谱(NRS)及表面增强拉曼光谱(SERS), 归属了拉曼特征峰, 并与固体小檗碱的 NRS 进行对比, 发现特征峰位基本没变. 研究小檗碱与纳米银(Ag-Berberine)、包裹牛血清白蛋白(BSA)的线状银(Ag@BSA-Berberine)的拉曼光谱, 分析了线性纳米银(Ag)及包裹 BSA 的线状银(Ag@BSA)对小檗碱的吸附模型. 结果显示, 线性纳米银对小檗碱、牛血清白蛋白有明显的拉曼增强效应, 增强效应主要在线性纳米银与氨基酸中 N 的孤电子对、甲氧基中的氧、苯环中的 π 电子及异喹啉中的 N 发生了吸附作用. 对比 Ag@BSA-Berberine 和 Ag-Berberine 的特征峰, 加了 BSA 后的拉曼光谱有明显的减弱, 但峰位并没有移动, 但是有 BSA 修饰的纳米银的小檗碱拉曼光谱有较高的稳定性, 利于小檗碱的进一步研究.

关键词: 拉曼光谱; 表面增强拉曼光谱; 线性纳米银; 牛血清白蛋白; 小檗碱

中图分类号: O657.37

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)11-0113-06

多数生物碱有较强的生理活性. 小檗碱(Berberine)又称黄连素, 是黄连、黄柏及三颗针等药用植物的重要组成部分, 是一种常见的异喹啉生物碱, 具有抗菌、降压、抗炎等作用^[1]. 牛血清白蛋白(BSA)是生物大分子通过氨基酸的肽链链接起来, 能够提供拉曼信号的主要结构是肽链的酰胺 I、酰胺 III、氨基酸残基(侧链)及硫—硫桥键谱带等^[2]. BSA 由于其静电作用和立体的空间结构, 还包含有大量的侧链区域, 在较高离子浓度条件下, 仍有极好的稳定性^[3].

大约经过 40 年的发展, 表面增强拉曼光谱(SERS)已经广泛地应用在各个研究领域, 包括合成高分子、蛋白质、核酸等^[4]. 由于拉曼散射很弱, 拉曼光谱的灵敏度很低, 只有入射光的 $10^{-8} \sim 10^{-6}$. 当拉曼光谱与纳米结构的物质联系在一起, 拉曼效应得到了很大的提高^[5-6]. 以金、银胶体, 棒、线、立方状纳米金银, 金银复合纳米粒子的 SERS 基底已有相关研究^[7-9]. 目前对小檗碱的研究有近红外漫反射^[10]、TLC-UV^[11]、红外和核磁共振光谱^[12]、薄层层析-分光光度法^[13]等, 但是利用拉曼光谱对其研究尚未见相关报道. BSA 能防止分子进一步地聚集, 在一些复杂的环境中, 如高离子浓度、不同的酸碱条件下, 保证其稳定性和灵敏度^[3]. Xianggrong Li 等人^[14]研究了类胡萝卜素与 BSA 和 HSA 的相互作用, 发现类胡萝卜素能够猝灭血清蛋白的荧光. 本文主要研究小檗碱的 SERS, 把 BSA 作为稳定剂, 在线性纳米银的表面上包裹了一层 BSA, BSA 有很多立体空间构型, 能有序而稳定地吸附小檗碱. 虽然拉曼峰强度有所减弱, 但峰型的稳定增加.

1 实验部分

1.1 实验仪器与试剂

FS-100 型傅里叶变换拉曼光谱仪(德国 Bruker 公司), Nd: YAG 激光光源, 液氮冷却 Ge 检测器;

① 收稿日期: 2015-07-21

基金项目: 国家自然科学基金(21277110).

作者简介: 张彩红(1990-), 女, 四川成都人, 硕士研究生, 主要从事拉曼光谱的研究.

通信作者: 周光明, 教授, 博士研究生导师.

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司); 80-1 台式低速离心机(金坛科技仪器有限公司).

盐酸小檗碱(阿拉丁)、三(羟甲基)氨基甲烷购于天津市科密欧化学试剂有限公司; 牛血清白蛋白(BSA)购于如吉生物科技; 硝酸银(AgNO_3)、氯化钠(NaCl)、六水三氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、乙醇($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)和乙二醇($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$)均为分析纯, 均购于重庆川东化工(集团)有限公司; 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)为分析纯, 购于国药集团化学试剂有限公司.

1.2 实验步骤

依据 Ma Jingjing^[15]的方法制备线性银纳米. AgNO_3 作为银源, 乙二醇作为还原剂, 将 PVP 溶于乙二醇中, 配制 0.3 mol/L 的 PVP 溶液, 取 40 mL 0.3 mol/L 的 PVP 溶液加入到 250 mL 的烧杯中, 在恒温磁力搅拌加热器中, 油浴加热从 25 °C 到 160 °C, 恒温保持, 加入 100 μL 0.15 mmol 的 FeCl_3 溶液, 5 min 后, 加入 100 μL 0.3 mmol/L 的 NaCl 溶液, 5 min 后, 加入 10 mL 0.15 mol/L 的 AgNO_3 溶液, 开始以缓慢的滴速加入, 当溶液变成灰色时, 加入所有的 AgNO_3 溶液, 反应 2 h, 得到灰色胶体并冷却至室温, 用乙醇多次清洗, 以 4000 r/min 的转速在离心机离心分离. 将灰色胶体置于冰箱备用.

配制浓度为 1.0×10^{-3} mol/L 的小檗碱溶液和 BSA 溶液, BSA 溶液用 pH=7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液定容, 测定 BSA 和小檗碱的常规拉曼光谱(NRS)和 SERS, 再将 Ag@BSA 与 Berberine、Ag 与 Berberine 分别按照 1:1, 1:2, 1:3 和 1:4 的比例混合反应, 然后在干燥的玻璃片上, 于室温下干燥, 进行 SERS 检测.

2 结果与讨论

2.1 线性纳米银表征

制备的线性纳米银通过离心分离提纯后得到浓度较大的纳米银, 分散在乙醇里, 保存在 4 °C. 取少量稀释后滴加在干净的硅片上. 图 1 为线性纳米银的 SEM 图, 由图 1 可看出大部分纳米银呈线状, 且长短大小均一, 有少部分呈球形, 在乙醇溶液里具有良好的分散性. 目标分子吸附在纳米银上, 其拉曼效益增强.

2.2 BSA 的拉曼光谱和 SERS

加入线性纳米银的 BSA 有很强的增强效应(图 2). 图 2 中 b 是 BSA 的拉曼光谱, 能看出 2 个特征峰, 564 cm^{-1} 归属于 S—S 键的伸缩振动, $1\,095\text{ cm}^{-1}$ 归属于 C—N 键的伸缩振动, 不能明显地显示出其它特征峰, 因此不便于 BSA 的相关研究. 图 2 中 a 是纳米银与 BSA 按照 1:1 混合的拉曼光谱, 与 b 相比较, 出现了很多特征峰. $1\,665\text{ cm}^{-1}$ 归属于酰胺 I 谱带振动, 主要包括 C=O 伸缩振动和 N—H 面内变形振动, $1\,302\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,240\text{ cm}^{-1}$ 归属于酰胺 III 谱带 C—N 伸缩振动. $1\,461\text{ cm}^{-1}$ 归属于色氨酸残基环中 O—C=O 对称伸缩振动, 927 cm^{-1} 氨基酸中 C—C—N 伸缩振动及 α -螺旋结构, 都有向高波数方向移动, 频率降低. 755 cm^{-1} 和 $1\,461\text{ cm}^{-1}$ 分别归属于酪氨酸、色氨酸残基振动峰, 这 2 个振动峰有明显的增强, 可能由于 Ag—N 键的作用, 故向低波数方向移动.

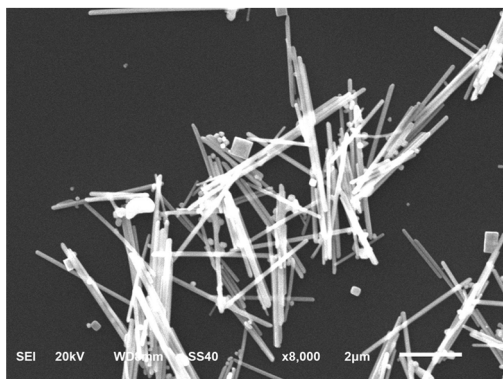


图 1 线性纳米银的 SEM 图

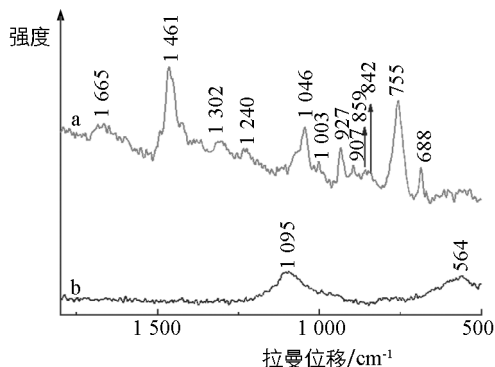


图 2 BSA 的 SERS(a)和常规拉曼光谱(b)

2.3 小檗碱溶液的常规拉曼光谱和 SERS

小檗碱是异喹啉类药物. 小檗碱的结构见图 3, 小檗碱能溶于水, 配制成 1.0×10^{-3} mol/L 小檗碱的水溶液, 滴加在玻璃片上于室温下晾干. 图 4 中 a 是小檗碱溶液在纳米银中的 SERS, b 是小檗碱溶液的 NRS, 基本上看不出小檗碱的特征峰, 图 5 是小檗碱溶液的从 $1\,700\text{ cm}^{-1}$ 到 200 cm^{-1} 放大的 NRS 图. 由图 4 和图 5 可看出, 有些明显的峰位基本一致, 其中有些峰还有一些移动, 峰的强度有明显的增大. 通过对常规拉曼的对比, SERS 在 $3\,071\text{ cm}^{-1}$ 的 =C-H 的伸缩振动、 $1\,392\text{ cm}^{-1}$ 的 CH_3 变形伸缩振动有明显的特征峰; $1\,476\text{ cm}^{-1}$ 的 CH_3 不对称伸缩振动移到了 $1\,420\text{ cm}^{-1}$ 说明分子中甲氧基中的氧结合, 使其表现出特征峰; $1\,667\text{ cm}^{-1}$ 的芳烃 C=C 骨架伸缩振动移动了 $1\,562\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,503\text{ cm}^{-1}$ 处, 峰形发生了改变, 苯环是一个含有 π 电子的共轭体系, 说明银纳米与 π 电子发生了吸附; $1\,562\text{ cm}^{-1}$ 的 C=C 伸缩振动和 756 cm^{-1} 芳烃中的 C-H 伸缩振动明显增强; $1\,225\text{ cm}^{-1}$ 的 C-N 伸缩振动移动到了 $1\,274\text{ cm}^{-1}$, 峰也明显增强, 异喹啉中的 C-N 中的 N 有孤电子, 与银纳米发生吸附; 934 cm^{-1} 和 893 cm^{-1} 的环氧不对称变形振动移动到了 877 cm^{-1} 和 835 cm^{-1} , 与苯环侧链有个环氧基中的氧结合.

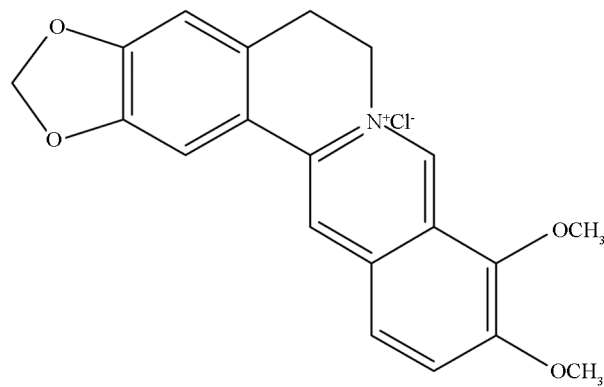


图 3 小檗碱的结构图

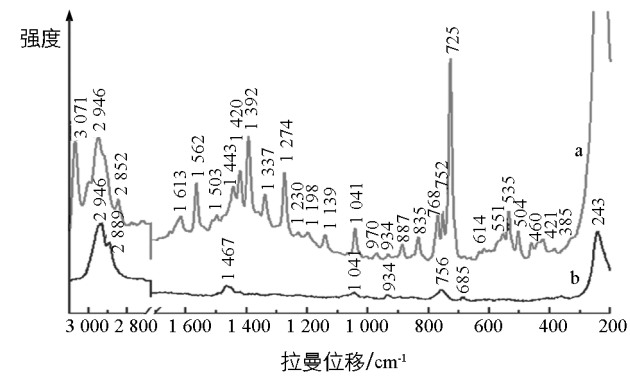


图 4 小檗碱的 SERS(a)和常规拉曼光谱(b)

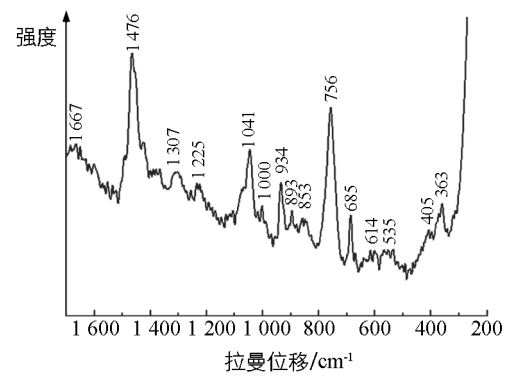


图 5 小檗碱的常规拉曼光谱 ($1\,700\sim200\text{ cm}^{-1}$)

由图 6 固体小檗碱的常规拉曼(b)和液体小檗碱的 SERS(a)相比, 峰的位置基本没变, SERS 的 $535, 504, 460, 421\text{ cm}^{-1}$ 的骨架变形振动, $752, 725\text{ cm}^{-1}$ 的 C-H 面外变形振动, 887 cm^{-1} 的环氧不对称伸缩振动和 $1\,337\text{ cm}^{-1}$ 的 C-N 伸缩振动都有明显的增强; $1\,139, 1\,041\text{ cm}^{-1}$ 处的 C-O-C 伸缩振动在增强拉曼中有较强的特征峰, 而在常规拉曼中不明显; $2\,946\text{ cm}^{-1}$ 和 $2\,889\text{ cm}^{-1}$ 的 C-H 伸缩振动在常规拉曼中出现了峰的分裂, 而在液体中没有明显的峰分裂, 这是由于水中含有大量的 O-H 键的伸缩振动. 由此可见, 以线性

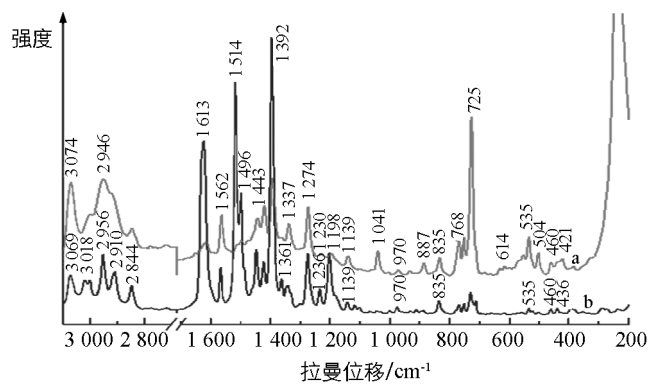


图 6 液体小檗碱的 SERS(a)和固体小檗碱的常规拉曼光谱(b)

纳米银为基底的小檗碱溶液的 SERS 的光谱可行, 纳米银与小檗碱中的甲氧基中的氧、苯环中的 π 电子及异喹啉中的 N 发生了吸附作用, 得到了较好的 SERS 光谱图. 小檗碱的拉曼位移及其归属见表 1.

表 1 小檗碱的拉曼位移及其归属

NRS/cm ⁻¹	SERS/cm ⁻¹	Assignment
	3 071(s)	ν(=C—H)
2 946(s)	2 946(s)	ν(C—H)
2 889(m)	2 852(m)	
1 667(w)	1 613(w)	ν(C=C) ph
	1 562(s)	
1 476(s)	1 503(w)	ν _{as} (CH ₃)
	1 443(w)	
		σ(CH ₂)
	1 420(m)	ν(C—N)
	1 392(s)	ν _{as} (CH ₃)
		δ(CH ₂)
1 307(m)	1 337(m)	ν(C—N)
1 225(w)	1 274(s)	ν(C—N)
	1 230(w)	
1 041(s)	1 139(m)	ν(C—O—C)
	1 041(s)	
1 000(m)	934(w)	br ν _{as} (—O—)
934(s)	887(m)	br ν(—O—)
893(m)	835(m)	
	768(m)	
756(s)	752(m)	ω(C—H) ph
	725(s)	
	535(m)	
535(w)	504(w)	
405(w)	460(w)	骨架振动
363(m)	421(w)	
	385(w)	

注：ν，伸缩振动；σ，剪式；ρ，面内摇摆；ω，面外摇摆；τ，扭曲振动；δ，变形振动；br，环呼吸；s，对称；as，非对称；ph，苯环；S，强峰；m，中等强度峰；w，弱峰。

2.4 小檗碱和 BSA 相互作用的研究

本部分研究了小檗碱与 BSA 作用的 SERS 变化情况，小檗碱与 BSA 复合物的 SERS 信号比小檗碱本身的 SERS 信号强度明显减弱。BSA 的特征峰有 1 461,1 046,755 cm⁻¹，小檗碱的特征峰有 1 392,1 041,525 cm⁻¹，图 7 中 b 为 Ag@BSA-Berberine 按 1 : 3 的比例混合的复合物的 SERS 信号，与 Ag-Berberine 相比特征峰的强度明显降低，与小檗碱的 SERS 相比特征峰的位子基本一致，表明小檗碱与 BSA 相互作用后，自身结构基本不变，发生了能量的变化^[13]。

不同比例的 Ag-Berberine 和 Ag@BSA-Berberine 的 SERS 信号从 1 : 5,1 : 4,1 : 3,1 : 2,1 : 1 依次减弱(图 8—9)，峰的位置基本没变。Ag-Berberine 的 SERS 信号在比例为 1 : 2 和 1 : 1 时，在 535 cm⁻¹和

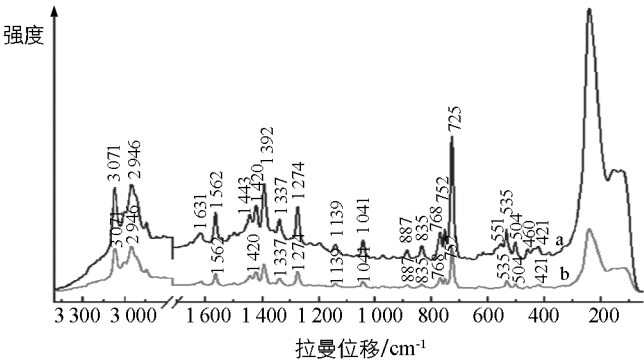


图 7 小檗碱的 SERS(a)和
小檗碱和 BSA 的 SERS(b)

1 392 cm^{-1} 附近出现的峰不稳定,说明小檗碱直接吸附在银纳米表面不规则.小檗碱吸附在有 BSA 包裹的纳米银上,受到空间位阻的影响,SERS 信号相对降低了,由于 BSA 具有大量的空间结构,氨基酸残基,使小檗碱的吸附更有规律、更稳定,使得拉曼信号很稳定,在相对小浓度下的小檗碱的拉曼信号仍然稳定.BSA 含有大量的侧链区域,通过静电作用连接在银纳米上,在一些立体的空间结构能够均匀而稳定有序地吸附小檗碱,而且能防止纳米银的团聚.

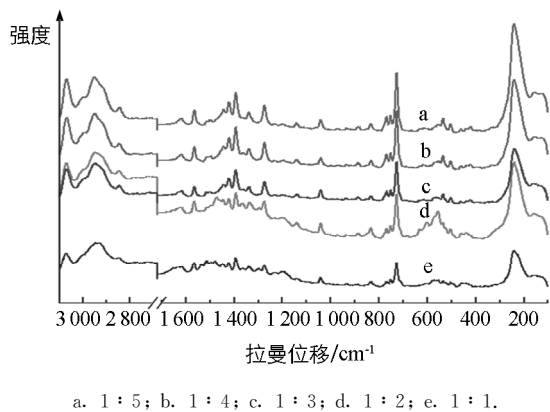


图 8 线性银纳米与不同比例的小檗碱混合拉曼光谱图

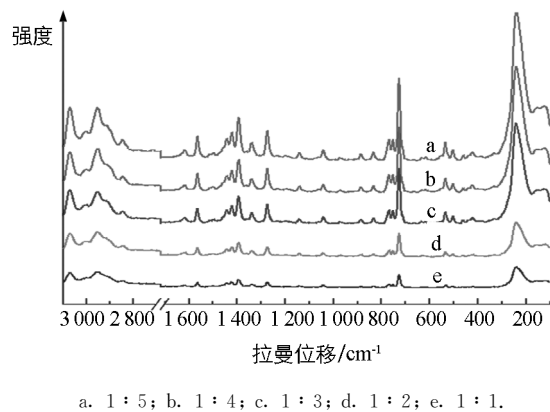


图 9 线性银纳米混合 BSA 与不同比例的小檗碱的拉曼光谱图

3 结 论

通过对小檗碱 SERS 的研究,无损、快速、准确、简便、有效地建立了小檗碱的拉曼光谱图,并对其主要峰进行了归属.本文主要用线性纳米银作为增强效应基底,由实验可得出,线性纳米银具有很强的拉曼增强效应,分析了小檗碱和 BSA 与纳米银的吸附方式,纳米银主要与小檗碱和 BSA 中的含有孤电子的 N 原子、蛋白质中二硫键中的 S 原子、甲氧基中的氧及苯环中的 π 电子发生了吸附作用. Ag-Berberine 和 Ag@BSA-Berberine 比较,有 BSA 包裹的纳米银的增强效应有所降低,但峰的位子没有发生改变,BSA 中有序的立体空间结构,稳定吸附了小檗碱,使峰的稳定性增强.以 Ag@BSA 作为增强基底的拉曼光谱法对小檗碱的深入研究和鉴别提供了简便有效的分析方法.

参考文献:

[1] 陈 竹,曲中堂,曾 雪,等. 9-O-小檗碱糖苷系列产物的合成及体内降糖活性初步研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2002, 34(5): 146—151.

[2] HU C Y, YANG D P, ZHU F J, et al. Enzyme-Labeled Pt@BSA Nanocomposite as a Facile Electrochemical Biosensing Interface for Sensitive Glucose Determination [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2014, 6(6): 4170—4178.

[3] JI W, CHEN L, XUE X G. Design of Anti-Aggregated SERS Sensing Platform for Metal Ion Detection Based on Bovine Serum Albumin-Mediated Metal Nanoparticles [J]. Chem Comm Communication, 2013, 49(66): 7334—7336.

[4] TANG L J, LI S, HAN F, et al. SERS-Active Au@Ag Nanorod Dimer for Ultrasensitive Dopamine Detection [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2015, 71: 7—12.

[5] ZHENG X S, HU P, GUI Y, et al. BSA-Coated Nanoparticles for Improved SERS-Based Intracellular pH Sensing [J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(24): 12250—12257.

[6] ZHONG R B, LIU Y S, ZHANG P, et al. Discrete Nanoparticle-BSA Conjugatrs Manipulated by Hydrophobic Interaction [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2014, 6(22): 19465—19470.

[7] 吴 捷,周光明,虞丹尼,等. 利用 SERS 表面增强拉曼光谱技术对维生素 M 在银胶颗粒表面吸附行为的研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2009, 31(1): 37—40.

[8] GUI R J, JIN H. Aqueous Synthesis of Human Serum Albumin-Stabilized Fluorescent Au/Ag Core/Shell Nanocrystals for Highly Sensitive and Selective Sensing of Copper(II) [J]. Analyst, 2013, 138(23): 7197—7205.

[9] KO F H, CHANG Y C. Aptamer Based Surface Enhanced Raman Scattering Detection of Adenosine Using Various Core

Sizes of Au-Ag Core-Shell Nanoparticles [J]. RSC Advances, 2014, 4(50): 26251—26257.

- [10] 周 旻, 王天志, 叶利明, 等. 近红外漫反射光谱法测定川产黄柏中小檗碱含量 [J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(8): 1527—1530.
- [11] 王 锐, 何 崑, 袁晓春, 等. TLC-UV 法测定复方黄连素片中盐酸小檗碱 [J]. 广东化工, 2012, 39(1): 112, 104.
- [12] 郑保忠, 何 菱, 胥佩菱. 小檗碱衍生物的红外、紫外及核磁共振光谱 [J]. 华西药学杂志, 1987, 2(2): 90—94.
- [13] 赵 倩, 敖 利, 朱祯祿. 薄层层析—分光光度法测定通络解毒搽剂中盐酸小檗碱含量 [J]. 儿科药学杂志, 2006, 12(1): 41—42.
- [14] LI X G, WANG G K, CHEN D J, et al. β -Carotene and Astaxanthin with Human and Bovine Serum Albumins [J]. Food Chemistry, 2015, 179: 213—221.
- [15] MA J J, ZHAN M S. Rapid Production of Silver Nanowires Based on High Concentration of AgNO_3 Precursor and Use of FeCl_3 as Reaction Promoter [J]. RSC Advances Paper, 2014, 4(40): 21060—21071.

Surface Enhanced Raman Spectroscopy Study of Berberine Based on BSA-Coated Silver Nanowires

ZHANG Cai-hong, ZHOU Guang-ming,
CHENG Hong-mei, LI Jun-ping

School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: The normal Raman spectroscopy (NRS) and surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) of the solutions for berberine were reported, and the vibrational peaks were assigned. SERS of solutions and NRS of solids for berberine were compared. The results showed that the positions of characteristic peaks were not changed, but the strengthen of peaks were enhanced relatively. The study of the SERS spectra of berberine with silver nanowires (Ag-Berberine) and that with bovine serum albumin(BSA)-coated silver nanowires (Ag@BSA-Berberine) were analyzed the influence on their systems and the adsorption way of silver nanowires. The results indicated that the SERS spectra of Ag-Berberine increased obviously, which developed a convenient way to analyze the characteristic peaks of berberine. Enhanced Raman spectra expressed that Ag nanowires were linked to N atom of amino acid, O atom of methoxyl, electron of benzene ring and N atom of isoquinoline. Compared the SERS spectra of Ag-Berberine and Ag@BSA-Berberine, it displayed that the SERS spectra of Ag@BSA-Berberine was lower than Ag-Berberine, but it was represented highly stabilization and peaks of Berberine were not maced, which provided important information for further study.

Key words: Raman; surface enhanced Raman spectroscopy (SERS); Ag nanowires; BSA; berberine

责任编辑 潘春燕

