

血红素在有序分子膜中的行为研究

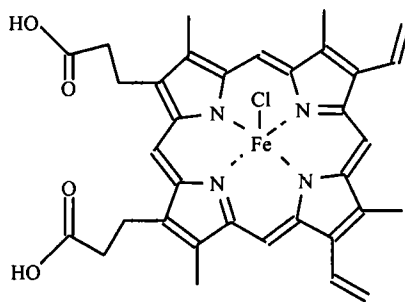
欧阳健明

(暨南大学化学系, 广州 510632)

本文研究了血红素(Heme)在硬脂酸(SA)单分子膜和 Langmuir-Blodgett(LB)膜中的行为。Heme 及其与 SA 的混合物均能在纯水亚相形成稳定的单分子膜。当摩尔分数 $x_{\text{Heme}} < 0.3$ 时, Heme 以“面接触亚相”的方式平躺在 SA 所形成的单分子膜中; 而当 $x_{\text{Heme}} \geq 0.3$ 时, Heme 以其“边接触亚相”的方式自身成膜。通过在不同表面压和不同摩尔比下沉积的 Heme-SA 混合 LB 膜的紫外-可见光谱、偏振紫外-可见光谱、小角 X-射线衍射和荧光光谱, 表征了血红素在有序分子膜中的排列取向和形态, 为日后进一步研究血红素在生物系统中的化学物理机制提供了有价值的信息。

关键词: Heme 混合单分子膜 混合 LB 膜
分类号: O631 O614.242

血红素(Heme)是一种天然的卟啉-铁配合物, 其分子为环状的四吡咯化合物。血红素的结构式如 Scheme 1 所示, 它是机体中铁的主要存在形式之一^[1]。血红素作为辅基所构成的金属蛋白和金属酶具有十分重要的生物学意义^[2]。其中, 血红蛋白担负起 O_2 及 CO_2 的运输作用。血红素也是细胞色素 P_{450} 、细胞色素 c、a、b 等酶蛋白分子间电子传递反应的载体。生物体内的一些电子传递反应是通过血红素中的 $\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}$ 变化实现的^[3,4]。



Scheme 1 Molecular structure of Heme

对血红素的电化学行为和各种电极过程的机理研究已有不少报道^[5,6], 而对血红素在有序分子膜中的行为研究未见报道。由于有序分子膜的结构类似细胞膜, 以有序分子膜为基质的模拟体系, 可以在体外形成特殊的隔室来有效地模拟生物膜。隔室内微环境中 pH、金属离子、过饱和度、温度等因素对血红素物理化学性能的影响相比于细胞膜体系变得简单。为此, 我们研究了血红素在有序分子膜中的行为, 从化学模拟的角度, 探索血红素在有序分子膜体系中的取向和形态, 为日后进一步研究血红素在生物系统中的化学物理机制, 在体外模拟氧载体等提供有价值的信息。

1 实验部分

1.1 材料

血红素(Heme)为 Sigma 公司产品, Heme 和硬脂酸(SA)的浓度均为 $4.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

收稿日期: 2000-12-31。收修改稿日期: 2001-02-09。

国家自然科学基金重点项目(No. 20031010), 教育部重点科学技术项目(1998-121)和广东省自然科学基金(No. 980898)。

作者: 欧阳健明, 男, 36 岁, 博士; 研究方向: 膜模拟化学及功能材料。

L^{-1} 。实验表明 Heme 在冰箱里存放四周不对其单分子成膜性能产生影响。实验用水均为从石英亚沸蒸馏器制得的二次蒸馏水。

1.2 表面压-面积(π -A)等温线测定及 LB 膜的制备

将一定体积的成膜物质的 $CHCl_3$ 溶液缓慢均匀地滴入拉膜仪槽内的亚相表面,待溶剂在表面扩散并挥发约 15min 后,测定 π -A 等温线。压膜速度为 $0.030nm^2 \cdot mol^{-1} \cdot min^{-1}$,所有实验均重复 2 次以上。

单分子膜压缩至一定表面压并保持约 20min 后,可以容易地被转移至石英基片上。采用垂直提拉法,提膜速度为 $5mm \cdot min^{-1}$ 。当采用亲水表面的基片成膜时,首先将基片浸入亚相中,然后铺展两亲分子并压缩单分子层膜至一定表面压后提膜^[7]。每提完一层膜后,停留 2min 再提下一层。

所有压缩单分子层和制备 LB 膜的工作均在一个无尘箱内完成,温度 $25 \pm 1^\circ C$ 。

1.3 石英基片的洗涤和亲水处理

先将石英基片在 CH_2Cl_2 中煮沸 2 min 后,用丙酮和二次水依次冲洗。于 $1mol \cdot L^{-1}$ 的 NaOH 水溶液中超声约 5min,用二次水冲洗干净,再用丙酮洗涤干燥,得亲水基片。

1.4 仪器

拉膜仪为东南大学设计的微机控制双向压缩 WM-II 型 LB 槽自动控制系统,自动记录 π -A 曲线。小角 X 射线衍射采用日本理学 D/max RB(Rigaku)型转靶 X 射线衍射仪,石墨单色器,狭缝为 $DS = 0.5^\circ$, $SS = 0.5^\circ$, $RS = 0.14mm$, $RSm = 0.6mm$,管压为 40 kV,管流 50mA, $Cu K\alpha$ 靶, $\lambda = 0.154nm$;Perkin-Elmer LS 50 B 型荧光光谱仪。

2 结果与讨论

2.1 血红素-硬脂酸混合单分子膜

为了指明混合单分子膜中 Heme 的浓度,使用摩尔分数 x_{Heme} :

$$x_{Heme} = \frac{n_{Heme}}{n_{Heme} + n_{SA}} \quad (1)$$

式中 n 为 Heme 和 SA 的摩尔数。将 Heme 和 SA 两个溶液按不同摩尔比混合后在纯水亚相表面铺展, Heme、SA 及其混合物均可以在纯水亚相表面形成稳定的单分子膜。图 1 为不同摩尔比的 Heme-SA 混合物的 π -A 等温线。纯 SA 的单分子截面积(A_0)为 $0.21nm^2$,与文献值一致^[8]。Heme 的 A_0 值为 $0.73nm^2$,其崩溃压约为 $27mN \cdot m^{-1}$ 。随着 Heme 摩尔分数的增加,混合物的 A_0 值增加,崩溃压下降。

图 2 为不同表面压下 Heme 与 SA 混合单分子膜的加和性规律图。其中直线为根据公式:

$$A_{mix} = n_{Heme} A_{Heme} + n_{SA} A_{SA} \quad (2)$$

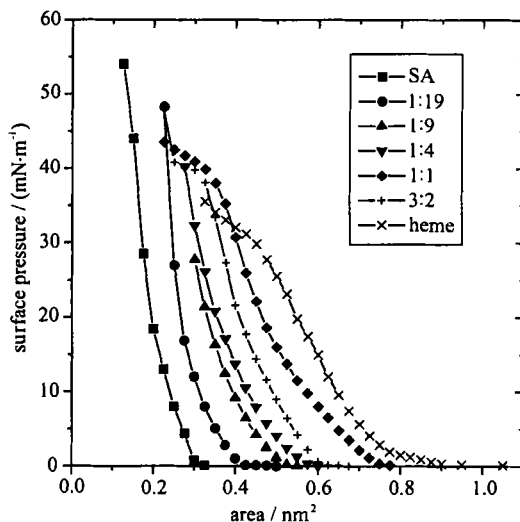


图 1 在纯水亚相表面不同摩尔比 Heme-SA 混合单分子膜的 π -A 等温线

Fig. 1 π -A isotherms of the mixed monolayer of Heme-SA in different molar ratios on pure water subphases

计算得到的理论加和性。图 2 表明, 无论是高表面压 ($30\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$) 或低表面压 ($5\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$), Heme 和 SA 混合膜的平均分子占有面积均大于由方程 (2) 得到的数值 (A_{mix}), 混合膜呈现正的偏差。即 Heme 和 SA 混合后, 混合物所表现的面积值大于其理想混合时的面积值。特别是 $x_{\text{Heme}} < 0.3$ 时偏差较大。这表明在混合单分子膜中, Heme 与 SA 存在强的相互作用。

以混合膜中 Heme 的表观面积 A_{app} 对 x_{Heme} 作图 (图 3), 可见, $x_{\text{Heme}} < 0.3$ 时, A_{app} 随 Heme 含量的减少而显著增加。但当 $x_{\text{Heme}} \geq 0.3$ 时, A_{app} 较为稳定。由于根据分子填充模型 (C. P. K. 模型) 估算的 Heme 的单分子面积约为 2.0nm^2 , 故图 3 意味着 x_{Heme} 较小时, Heme 以“面接触亚相”的方式 (图 4a) 平躺在 SA 所形成的单分子膜中; 而当 Heme 含量较大时, Heme 以其“边接触亚相” (图 4b) 的方式自身成膜。

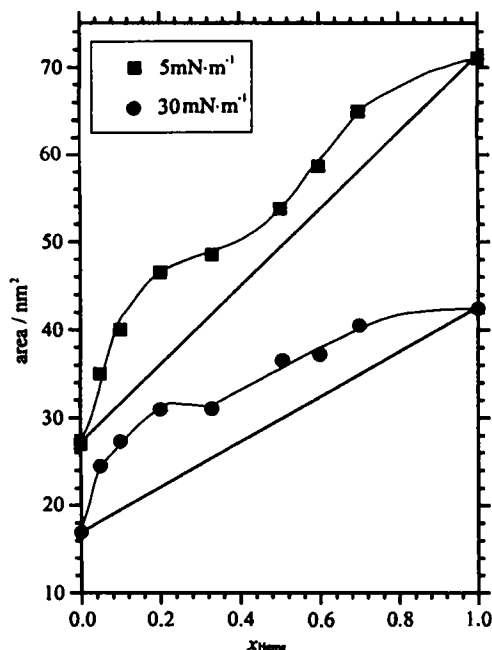


图 2 不同表面压下 Heme 与 SA 面积的加和性
直线为根据方程 (2) 计算得到的理论加和性

• Fig. 2 Molecular area of the Heme-SA mixed films determined at $\pi = 5$ and $30\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ as a function of x_{Heme} . The line were obtained from equation (2)

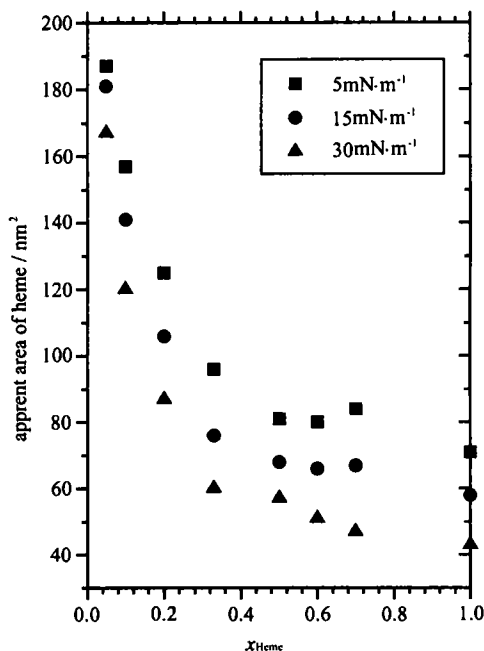


图 3 Heme 在不同摩尔比混合单分子膜中的表观面积

Fig. 3 Apparent area per Heme molecule in Heme-SA mixed monolayer as a function x_{Heme}

2.2 Heme-SA 混合 LB 膜的紫外 - 可见吸收光谱

在 CHCl_3 溶液中, 纯血红素出现四个吸收峰。分别为卟啉环的 Soret 带 (387.6nm) 和 Q 带 ($511.6, 541.4, 641.2\text{nm}$)。相比之下, Heme 在混合 LB 膜中的紫外 - 可见光谱出现红移。在 Heme-SA 混合 LB 膜中, Heme 的 Soret 带红移至 408.6nm , 红移了 21.0nm 。Q 带红移至 $522, 554$ 和 653nm , 比在 CHCl_3 溶液中红移了约 $10.4 \sim 12.6\text{nm}$ 。

沉积压对混合 LB 膜的紫外 - 可见光谱产生显著的影响, 如图 5a 所示。当沉积压从 10 增加到 $30\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 时, Heme 的 Soret 带从 406.5nm 增加至 409.0nm 。同时, 该吸收峰的吸光度也大大增加 (图 5b), 由 $10\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 时的 0.004 增加至 $30\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 时的 0.115 。尽管随着沉积压

的增加, 血红素在有序分子膜中的浓度会有所增加, 但引起血红素 Soret 带吸光度显著增加的主要原因是: 随着沉积压的增加, 血红素在膜中的有序性大大增加, 从而引起吸光度增加所致。

同时, 随着 Heme 摩尔分数的增加, Heme-SA 混合 LB 膜的 Soret 带亦出现红移(图 6a), 吸光度增加(图 6b)。如 x_{Heme} 从 0 增加至 1.0 时, Heme 的 Soret 带从 403.2 增加至 411nm(图 6a), 吸光度从 0.014 增加至 0.19(图 6b)。图 6 表明, 在 Heme-SA 混合 LB 膜中, 主要是 Heme 的聚集引起 LB 膜紫外-可见光谱的变化。

2.3 Heme-SA 混合 LB 膜的荧光光谱

Heme-SA 混合 LB 膜具有很强的荧光。在激发波长 $\lambda_{\text{ex}} = 380\text{nm}$ 时, 其荧光发射峰为 467nm。Heme 在 LB 膜中的荧光吸收峰比其在 CHCl_3 溶液中(460nm)红移了 7nm, 这进一步表明 Heme 在有序分子膜中形成了分子聚集态。

2.4 Heme 及 Heme-SA 混合 LB 膜的小角 X-射线衍射分析

小角 X 射线衍射分析是最常见、方便的表征 LB 膜中成膜分子排列、取向和厚度的方法之一。对于有限层 LB 膜类晶型薄膜的 X-射线衍射, 其主衍射峰(001 级峰)符合 Bragg 方程:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (3)$$

式中 d 为晶层间距, λ 为波长(对铜靶 $K\alpha$ 为 0.1548nm), n 为衍射级数, θ 为入射线与晶面法线的夹角。

小角 X-射线衍射结果表明, 双层纯 Heme LB 膜的出现一个衍射峰, 其周期(d 值)为 3.11nm。随着沉积压增加, d 值略有增加, 沉积压为 20 和 30mN·m⁻¹ 时, Heme LB 膜的 d 值分别为 3.108 和 3.153nm, 即随着沉积压的增加, Heme 在膜中与基片的倾斜角略有增加。

在 1:3($x_{\text{Heme}} = 0.25$) 的 Heme-SA 混合 LB 膜的 X-射线衍射图中, 出现了一个衍射峰, 衍射角(2θ)为 1.76°。表明混合 LB 膜具有层状有序结构。由衍射峰的位置计算出混合膜的 d 值为 5.03nm, 与纯 SA 的周期 $d = 5.038\text{nm}$ 吻合。即 Heme 的引入未改变 SA 的周期, LB 膜保持了 SA 的有序结构, 表明在 1:3 的 Heme-SA 混合 LB 膜中, Heme 被夹带在 SA 单分子层内, 这一结果与前面从 π -A 等温线得到的结果一致。

2.5 Heme-SA 混合 LB 膜的偏振吸收光谱

为了确定膜中血红素分子的大环平面在混合 LB 膜中的取向, 测定了混合 LB 膜的偏振紫外光谱, 其测量原理及有关符号的含义与文献^[9]相同。计算使用的公式为:

$$\langle \cos^2\theta \rangle = \frac{D_0 - (1 + D_0 \sin^2\beta)D_\beta}{(1 - 2\sin^2\beta)D_\beta - (1 + D_\beta \sin^2\beta)D_0} \quad (4)$$

$$\langle \sin^2\theta \cos^2\Phi \rangle = \frac{D_0 - \langle \cos^2\theta \rangle}{1 + D_0} \quad (5)$$

式中 θ , Φ 和 β 分别为血红素分子大环平面相对于基片的倾角, 血红素在 xy 平面内的方位角

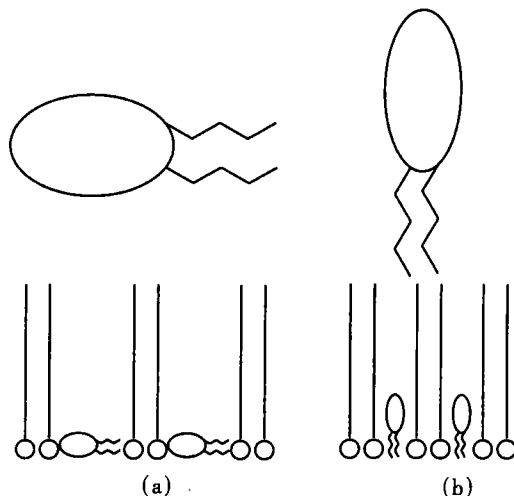


图 4 Heme 在 Heme-SA 混合单分子膜中的排列方式

Fig. 4 Arrangement of Heme in the mixed monolayer of Heme-SA (a) $x_{\text{Heme}} < 0.3$, (b) $x_{\text{Heme}} \geq 0.3$

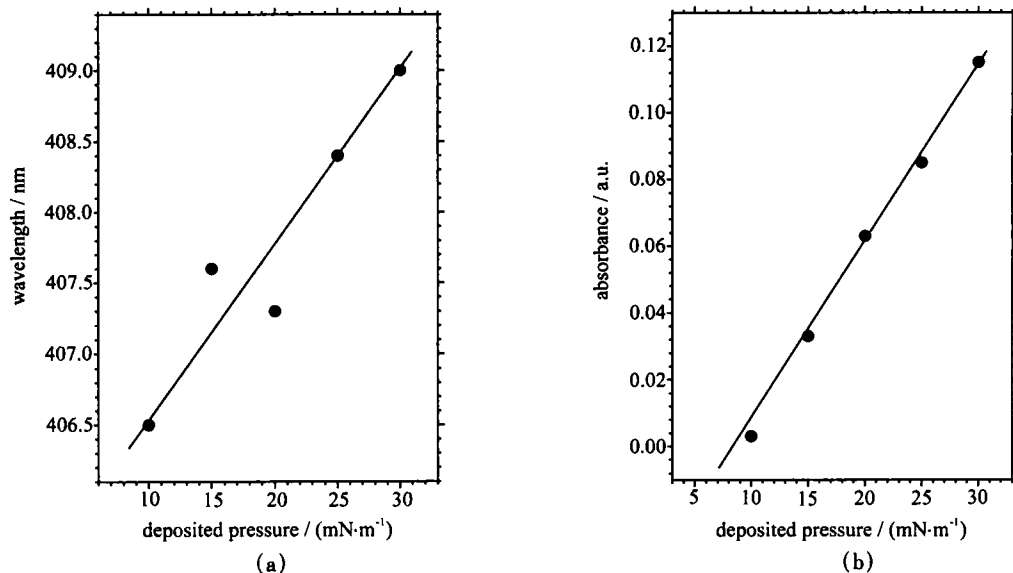


图5 沉积压对 Heme-SA(1:2)混合 LB 膜的吸收波长和吸光度的影响

Fig. 5 Effect of deposition pressure on (a) absorption wavelength and (b) absorbance of the mixed LB films of Heme-SA (1:2)

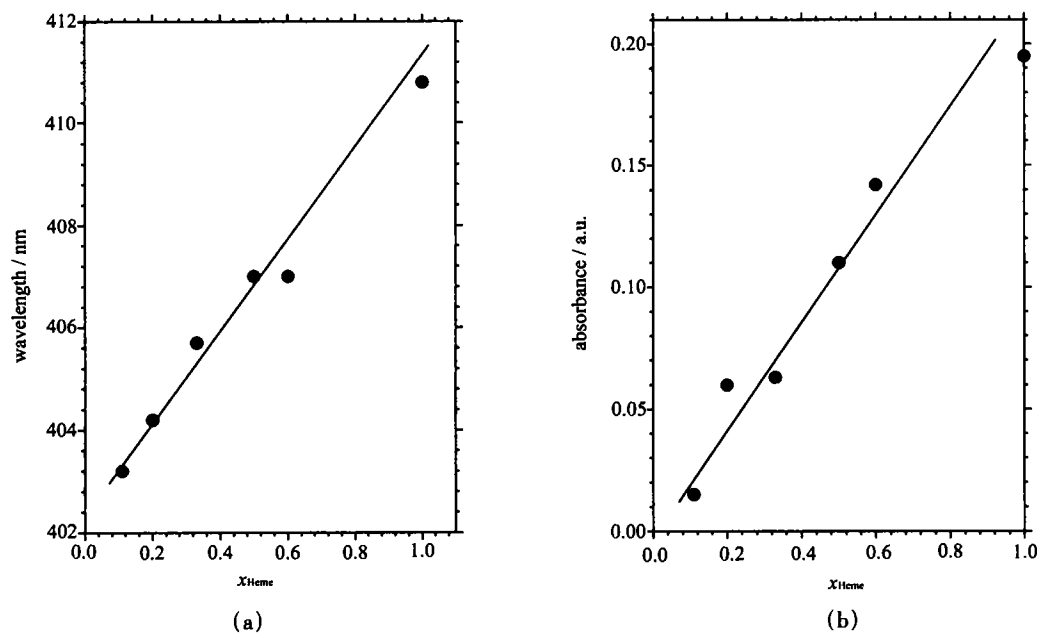


图6 摩尔分数对 Heme: -SA(1:2)混合 LB 膜的吸收波长(a)和吸光度(b)的影响

Fig. 6 Effect of molar fraction on (a) absorption wavelength and (b) absorbance of the mixed LB films of Heme-SA (1:2)

和光线的入射角。 $D_p = A_{//} / A_{\perp}$ ($A_{//}$ 和 $A_{\perp}$ 分别为偏振光的电矢量平行或垂直于浸渍方向时 LB 膜的吸光度)。测量时选择入射角 $\beta' = 0^\circ$ 和 $\beta' = 45^\circ$, 折射角 β 依据公式 $\beta = \sin^{-1}(n^{-1} \sin \beta')$ 计算得到^[10]。血红素 LB 膜的折射率约为 $n = 1.40$, 有关的数据和计算结果分别如下:

$$A_{//}(\beta' = 0^\circ) = 0.056, A_{\perp}(\beta' = 0^\circ) = 0.070, A_{//}(\beta' = 45^\circ) = 0.048, A_{\perp}(\beta' = 45^\circ) = 0.0495,$$

$D_0 = 0.80$, $D_\beta = 0.973$, $\theta = 25^\circ$.

由计算结果可知,在混合膜中血红素分子的大环平面相对于基片的倾角为 25° 。结合 π -A 等温线和小角 X-射线衍射的结果,可以认为:在零表面压时,血红素分子平躺在水面上,随着表面压的增大,血红素分子以两个丙酸基为支撑点倾斜竖起,由于血红素分子的疏水链较短,故其倾角较小,仅为 25° 。

参 考 文 献

- [1] TANG Ming-Long(唐明龙), JIN You-Yang(金游杨) *Yiyao Gongye(Pharmaceutical Industry)*, **1985**, **16**(8), 373.
- [2] Shao W. P., Sun H. Z., Yao Y. M. *Inorg. Chem.*, **1995**, **34**, 680.
- [3] LIN Xian-Jie(林宪杰), ZHAO Cheng-Da(赵成大) *Huaxue Tongbao(Chemistry)*, **1989**, (9), 27.
- [4] WU Yong-Lie(吴庸烈) *Huaxue Tongbao(Chemistry)*, **1983**, (11), 9.
- [5] ZENG Bai-Zhao(曾百肇), LI Dong-Hui(李东辉), ZHENG Yu-Xia(郑玉霞) *Fengxi Huaxue(Chinese Journal of Analytical Chemistry)*, **1991**, **19**(7), 742.
- [6] BAI Yan(白燕), MO Jin-Yuan(莫金垣), CHENG Qiang(程 锵), CHEN Shao-Hui(陈少晖) *Fengxi Shiyanshi(Chinese Journal of Analysis Laboratory)*, **1998**, **17**, 5.
- [7] Ouyang J. M., Zheng W. J., Li C., Xie Y. S. *Mater. Sci. Eng. C*, **1999**, **10**, 115.
- [8] Ouyang J. M., Li C., Ling W. H. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **1999**, **33**, 129.
- [9] Yoneyama M., Sugi M. *Jpn. J. Appl. Phys.*, **1986**, **25**, 961.
- [10] MU Jing(穆 劲), XIAO Tong(肖 童), XU Chuan-Shen(许传升) *Huaxue Xuebao(Acta Chim. Sinica)*, **1993**, **51**, 246.

The Investigation of Behavior of Heme in Ordered Molecular Films

OUYANG Jian-Ming

(Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou, 510632)

The monolayer formation and the deposition of Langmuir-Blodgett films of the mixtures of Heme and stearic acid with different molar ratio were investigated. The result shows that they can form stable monolayer on pure water subphase. When $x_{\text{Heme}} < 0.3$, Heme lies on a 'face on' position in the monolayer. When $x_{\text{Heme}} \geq 0.3$, Heme lies on an 'edge on' position. The Langmuir-Blodgett(LB) films of Heme and its mixtures with stearic acid were deposited on the hydrophilic quartz plates. Some information about the orientation of Heme in LB films were obtained from the UV-visible and polarized UV-visible spectra, low angle X-ray diffraction, and fluorescent spectra. The absorbance of the mixed LB films of Heme-SA is greatly increased with the increase of deposition pressure or the molar fraction of Heme. Although the increase of absorbance may be resulted from the increase of the Heme concentration in LB films at higher surface pressure, most of the increase was resulted from the ordered arrangement of Heme molecules. These results provide a good guidance for the further research and applications of Heme derivatives.

Keywords: Heme mixed monolayer mixed Langmuir-Blodgett film