

La(Ⅲ)、Eu(Ⅲ)与 HBED 配合的紫外差光谱研究

白海静 刘 文 杨斌盛*

(山西大学分子科学研究所, 太原 030006)

在 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸 (Hepes), pH 7.4, 室温条件下, 用紫外差光谱滴定观察了 La(Ⅲ)、Eu(Ⅲ)与 N,N'-二(2-羟苄基)乙二胺-N,N'-二乙酸 (HBED) 的结合。La(Ⅲ)、Eu(Ⅲ)与 HBED 的结合均形成 1:1 的配合物, 其紫外差光谱均于 238 和 292nm 处出现吸收峰, 在 238nm 处配合物 La-HBED 与 Eu-HBED 的摩尔吸光系数分别为: $\Delta\epsilon_{\text{La}} = (9.82 \pm 0.24) \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$, $\Delta\epsilon_{\text{Eu}} = (16.21 \pm 0.12) \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$; 配合物 La-HBED 与 Eu-HBED 的条件稳定常数分别为: $\lg K_{\text{La-HBED}} = 11.52 \pm 0.22$, $\lg K_{\text{Eu-HBED}} = 14.16 \pm 0.38$, 符合线性自由能关系。人血清转铁蛋白和 Eu(Ⅲ)结合的紫外差光谱与 HBED 和 Eu(Ⅲ)结合的紫外差光谱相似, 只是最大吸收峰红移至 345 和 296nm, 转铁蛋白不能与 La(Ⅲ)结合。

关键词: 转铁蛋白 HBED 镧系离子 紫外差光谱
分类号: O614.33

0 引言

人血清转铁蛋白是一分子量为 77000 的单肽链糖蛋白, 在生命体中参与铁的转移、输送、贮藏与调节^[1]。转铁蛋白中包含两个结构类似而化学性质不同的结构域, 在每个结构域中作为转铁蛋白天然底物的 Fe(Ⅲ)与两个酪氨酸的酚羟基, 组氨酸的咪唑基, 天冬氨酸的羧基及靠近精氨酸的碳酸根或碳酸氢根伴阴离子结合, 形成稳定的畸变八面体配合物^[2,3]。生理条件下, 转铁蛋白的结合部位仅有约 30% 被铁(Ⅲ)占据, 因此, 转铁蛋白可与许多其它金属离子结合^[4], 如稀土离子。N,N'-二(2-羟苄基)乙二胺-N,N'-二乙酸 (HBED), 分子结构见图 1, 具有与转铁蛋白类似的可与金属离子配位的 O、N 配位基团, 能够与金属离子形成稳定的六配位配合物^[5]。鉴于此, 本文选择 HBED 作为拟蛋白小分子, 监测其与 La(Ⅲ)、Eu(Ⅲ)结合的紫外差光谱, 确定配合物 La-HBED、Eu-HBED 的结合稳定常数, 探讨稀土离子大小对转铁蛋白与稀土离子结合的影响。

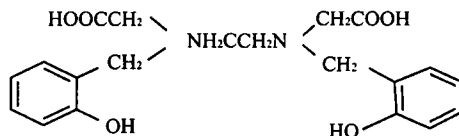


图 1 HBED 的分子结构

Fig. 1 Molecular structure of HBED

1 实验部分

1.1 材料

N,N'-二(2-羟苄基)乙二胺-N,N'-二乙酸 (HBED), 乙二胺四乙酸 (EDTA), N-2-羟乙基

收稿日期: 2000-12-25。收修改稿日期: 2001-03-19。

国家自然科学基金资助项目 (No. 20071022) 和山西省自然科学基金资助课题 (No. 991013)。

* 通讯联系人。

第一作者: 白海静, 女, 24 岁, 硕士研究生; 研究方向: 生物无机化学。

哌嗪-N'-2-乙磺酸(Hepes), $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 NaClO_4 均为分析纯;人血清脱铁转铁蛋白(apoTf)为 sigma 产品; Eu_2O_3 , La_2O_3 纯度达 99.9%。

1.2 方法

稀土离子储备液的配制:将稀土氧化物用足量的稀盐酸溶解,用水稀释至刻度备用。浓度的确定使用配合滴定法,滴定中使用 EDTA 为滴定剂,二甲酚橙为指示剂,在 pH 5.5 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液中进行。

蛋白质的纯化及双铁转铁蛋白的制备按前文^[6]进行。

紫外差光谱在 210~345nm 范围内使用 HP8453UV-Vis 光谱仪测定,光谱滴定中使用 1cm 吸收池。为了便于不同滴定数据的对比以及消除滴定中的稀释效应,数据处理中将吸光度转化为以 HBED 或蛋白质浓度表示的摩尔吸光度。实验中所需玻璃仪器及吸收池均用 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HNO_3 浸泡后蒸馏水冲洗干净备用。

2 结果与讨论

2.1 Eu(III)与 HBED 的结合

在 pH 7.4, $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes 条件下,将 2mL 浓度为 $6.22 \times 10^{-5}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HBED 置于干燥的 1cm 光谱池中,以 Eu(III)溶液滴定之,其紫外差光谱于 238 和 292nm 处出现两个正吸收峰,270nm 处出现一负吸收峰,260 和 278nm 处出现两个等吸收点,如图 2 所示,随 Eu(III)量的增加,吸收峰逐渐增高并最后停滞于某一最大值。

其中,238 和 292nm 处的吸收峰是由于 HBED 与 Eu(III)结合时酚羟基参与配位^[7],使得 HBED 的芳环受到微扰,从而影响 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁产生的。因此,该差光谱吸收峰能够表征 Eu-HBED 配合物的形成。为了消除滴加溶液引起的稀释效应,将 238nm 处的吸光度被 HBED 的分析浓度除,得出 Eu(III)与 HBED 结合的表现摩尔吸光度 $\Delta\epsilon$,以 238nm 处的表现摩尔吸光度 $\Delta\epsilon$ 对 Eu(III)与 HBED 的摩尔比作滴定曲线图(图 3a)。由图 3a 可见,滴定曲线在初始阶段呈线性增加,至 Eu(III)与 HBED 的摩尔比为 1.0 处出现明显的拐点,表明 Eu(III)与 HBED 形成 1:1 的稳定配合物,由此可认为滴定曲线的初始部分斜率是 Eu-HBED 配合物的摩尔吸光系数 $\Delta\epsilon_{\text{Eu}}$ 。根据图 3a 及重复滴定可得 $\Delta\epsilon_{\text{Eu}} = (16.21 \pm 0.12) \times 10^3 \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。

由于配合物 Eu-EDTA 于 238 和 292nm 处的紫外吸收微弱,可忽略不计,因此,滴定剂中竞争配体 EDTA 的引入并不影响配合物 Eu-HBED 的光谱特征。在相同条件下,分别以不同 $[\text{EDTA}]/[\text{Eu(III)}]$ (Rt)值的 Eu-EDTA 溶液替代 Eu(III)溶液滴定 HBED 并测定其紫外差光谱,均

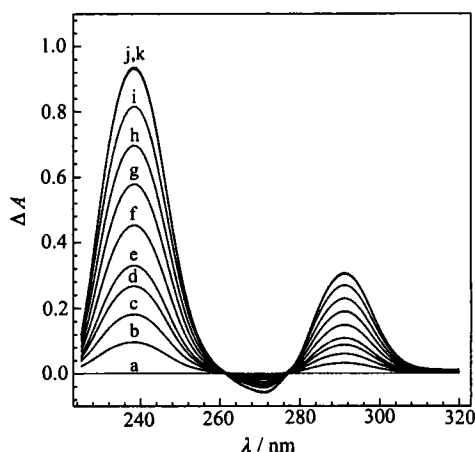


图 2 Eu(III) 滴定 HBED 的紫外差光谱

Fig. 2 Difference UV spectra produced by the addition of Eu(III) ($1.05 \times 10^{-3}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) to 2.0mL of HBED ($6.22 \times 10^{-5}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes at pH 7.4 and room temperature. The volume(μL) of Eu(III): a, 0; b, 10; c, 20; d, 30; e, 40; f, 55; g, 70; h, 85; i, 100; j, 120; k, 180

在 238 和 292nm 处出现吸收峰, 由于 EDTA 与 HBED 对 Eu(Ⅲ)的竞争配位, 相同 Eu(Ⅲ)浓度下其最大吸光度值要较未加 EDTA 时的低。将不同 R_t 值的 Eu-EDTA 溶液滴定 HBED 时, 238nm 处的表观摩尔吸光度对 Eu(Ⅲ)与 HBED 的摩尔比作图 3b、c, 由图 3b、c 可见, 滴定曲线初始部分斜率随 R_t 的增大而逐渐减小。设相同 Eu(Ⅲ)浓度下, EDTA 的引入导致表观摩尔吸光度的减小完全源于 Eu-EDTA 配合物的形成, 则由图 3a、b、c 可使用 (1) 式计算每一滴定点的 $[Eu-EDTA]$, 进而可使用 (2~6) 式及已知的 Eu-EDTA 稳定常数 $K_{Eu-EDTA}$ 计算每一滴定点的 $[Eu-HBED]$, $[Eu(Ⅲ)]_f$, $[HBED]_f$ 。由此, 可计算出 $\lg K_{Eu-HBED} = 14.16 \pm 0.38$ 。

$$[Eu-EDTA] = \frac{\Delta \varepsilon_{obs(a)} - \Delta \varepsilon_{obs(b,c)}}{\Delta \varepsilon_{Eu}} \cdot [HBED]_i \quad (1)$$

$$[EDTA]_f = [EDTA]_i - [Eu-EDTA] \quad (2)$$

$$[Eu(Ⅲ)]_f = \frac{[Eu-EDTA]}{[EDTA]_f K_{Eu-EDTA} \alpha_{EDTA}} \quad (3)$$

$$[Eu-HBED] = \frac{\Delta \varepsilon_{obs(a,b,c)}}{\Delta \varepsilon_{Eu}} \cdot [HBED]_i \quad (4)$$

$$[HBED]_f = [HBED]_i - [Eu-HBED] \quad (5)$$

$$K_{Eu-HBED} = \frac{[Eu-HBED]}{[Eu(Ⅲ)]_f [HBED]_f} \quad (6)$$

其中 $[Eu-HBED]$, $[HBED]_f$, $[HBED]_i$ 分别为 Eu-HBED 配合物的浓度, HBED 的游离浓度及 HBED 的总浓度; $[Eu-EDTA]$, $[EDTA]_f$, $[EDTA]_i$ 分别为 Eu-EDTA 配合物的浓度, EDTA 的游离浓度及 EDTA 的总浓度; $\Delta \varepsilon_{obs}$ 为表观摩尔吸光度, $\Delta \varepsilon_{Eu}$ 为 Eu-HBED 配合物的摩尔吸光系数。

2.2 La(Ⅲ)与 HBED 的结合

在 pH 7.4, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes 条件下, 以 La(Ⅲ)溶液、系列 La-EDTA 溶液滴定 HBED。同样在 238 和 292nm 处出现两个紫外差光谱吸收峰。将 238nm 处的表观摩尔吸光度对 La(Ⅲ)与 HBED 的摩尔比作图 4。根据图 4a 及重复实验可得 $\Delta \varepsilon_{La} = (9.82 \pm 0.24) \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。按 2.1 相同处理方式可计算出 $\lg K_{La-HBED} = 11.52 \pm 0.22$ 。

2.3 线性自由能关系

选择 19 种不同氨基酸配体与 La(Ⅲ), Eu(Ⅲ)形成配合物的稳定常数建立 La(Ⅲ), Eu(Ⅲ)间的自由能关系。以 La(Ⅲ)配合物稳定常数作横坐标, 以同一配体的 Eu(Ⅲ)配合物稳定常数作纵坐标, 作图 5。图 5 中, Eu(Ⅲ)配合物与 La(Ⅲ)配合物的稳定常数呈良好线性关系, 可用线性方程描述:

$$\lg K_{Eu} = (1.11 \pm 0.02) \lg K_{La} + (0.28 \pm 0.22) \quad r = 0.99 \quad (7)$$

由 (7) 式可见, 直线斜率为 1.1, 表明随着稀土离子半径的增大, 稀土配合物稳定常数减小。将

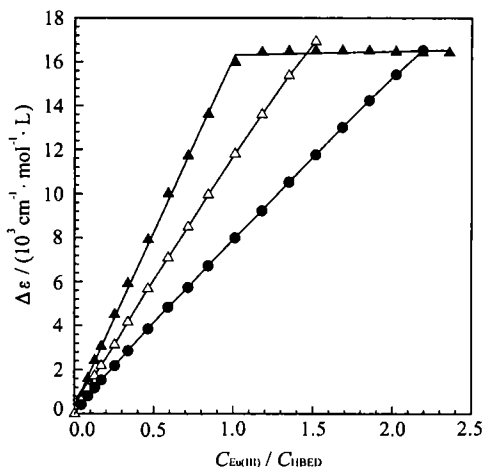


图3 Eu(Ⅲ)对 HBED 的滴定曲线图

Fig. 3 Titration curves for the addition of Eu(Ⅲ) titrants to HBED in $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes at pH 7.4 and room temperature

▲: (a) $R_t = 0$, △: (b) $R_t = 0.30$,
●: (c) $R_t = 0.60$, $R_t = [EDTA] / [Eu(Ⅲ)]$

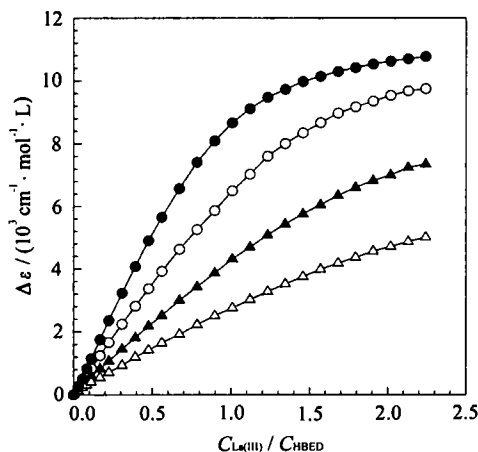


图 4 La(Ⅲ)对 HBED 的滴定曲线

Fig. 4 Titration curves for the addition of La(Ⅲ) titrants to HBED in $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes at pH 7.4 and room temperature
 ●: (a) $R_t = 0$, ○: (b) $R_t = 0.23$,
 ▼: (c) $R_t = 0.46$, ▽: (d) $R_t = 0.69$,
 $R_t = [\text{EDTA}] / [\text{La(Ⅲ)}]$

所测 La(Ⅲ)、Eu(Ⅲ)与 HBED 的结合稳定常数列于图 5 中, 可见 La-HBED 和 Eu-HBED 配合物稳定常数符合(7)式的线性关系。

2.4 La(Ⅲ), Eu(Ⅲ)与人血清转铁蛋白的结合

在 pH 7.4, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes 条件下, 用 Eu(Ⅲ)溶液滴定人血清脱铁转铁蛋白(apoTf), 其紫外差光谱^[6]与 Eu(Ⅲ)对 HBED 滴定的紫外差光谱极为相似, 在 245 和 296nm 处出现最大吸收峰, 比图 2 所示吸收峰分别红移 7nm 和 4nm。原因之一是 HBED 以邻位酚羟基配位, 而 apoTf 中的酪氨酸残基以对位酚羟基配位; 原因之二可能是由于 HBED 和 apoTf 中酚羟基所处环境不同。将 245nm 处的表观摩尔吸光度对 Eu(Ⅲ)与 apoTf 的摩尔比作图, 如图 6a。相同条件下, 作 Eu(Ⅲ)对血清双铁转铁蛋白(Tf)和 La(Ⅲ)对 apoTf 的滴定曲线, 分别如图 6b、c 所示。

由图 6b 可见, 即使 $[\text{Eu(Ⅲ)}] / [\text{Tf}]$ 达 4 以上, 245nm 处相应的表观摩尔吸光度仍很小, 这是由于 apoTf 与 Fe(Ⅲ)形成非常稳定的配合物^[8]

($\lg K$ 值达 20.7^[2]), 因此, Eu(Ⅲ)的滴加不会将 Tf 中结合的 Fe(Ⅲ)置换出来。已知 Eu(Ⅲ)与 apoTf 的 C 端结合稳定常数为 8.42^[6], 若 Eu(Ⅲ)、La(Ⅲ)与 apoTf 的结合稳定常数如 HBED 的情形一样

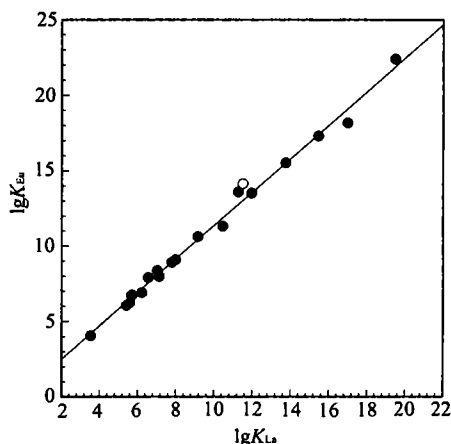


图 5 Eu(Ⅲ)与 La(Ⅲ)的线性自由能关系

Fig. 5 Linear free energy relationship for the complexes of Eu(Ⅲ) and La(Ⅲ) by 19 amino acids
 The opened circle represents $\lg K$ for HBED

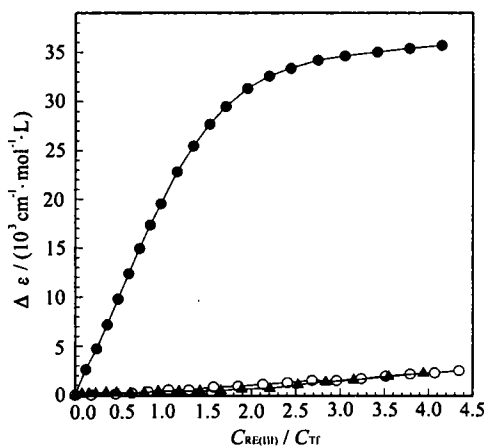


图 6 稀土离子对转铁蛋白的滴定曲线

Fig. 6 Titration curves for the addition of lanthanide ions to transferrin in $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes at pH 7.4 and room temperature
 ●: the addition of Eu(Ⅲ) to apotransferrin (a), ○: the addition of Eu(Ⅲ) to diferric-transferrin(b), ▲ the addition of La(Ⅲ) to apotransferrin(c)

符合线性方程(7),则根据(7)式,可知 La(Ⅲ)与 apoTf 的 C 端结合稳定常数为 7.35,反映于紫外差光谱,La(Ⅲ)与 apoTf 的结合应有明显的变化,然而由图 6c 可见,La(Ⅲ)对 apoTf 的滴定曲线与 Eu(Ⅲ)对 Tf 的滴定曲线基本重合,表明 La(Ⅲ)与 apoTf 的结合很弱,apoTf 的金属离子结合部位对稀土离子的大小有明显的选择性。

3 结 论

在 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes, pH 7.4, 室温条件下,HBED 与 La(Ⅲ),Eu(Ⅲ)可形成 1:1 的配合物;配合物 La-HBED 与 Eu-HBED 的摩尔吸光系数分别为 $\Delta\epsilon_{\text{La}} = (9.82 \pm 0.24) \times 10^3 \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$, $\Delta\epsilon_{\text{Eu}} = (16.21 \pm 0.12) \times 10^3 \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$, 配合物 La-HBED 与 Eu-HBED 的条件稳定常数分别为 $\lg K_{\text{La-HBED}} = 11.52 \pm 0.22$, $\lg K_{\text{Eu-HBED}} = 14.16 \pm 0.38$; 线性自由能关系表明 La-HBED、Eu-HBED 配合物的稳定性受离子半径的影响,离子半径较小的 Eu(Ⅲ),其配合物具有较 La(Ⅲ)配合物大的稳定性;脱铁转铁蛋白和 Eu(Ⅲ)结合的紫外差光谱与 HBED 和 Eu(Ⅲ)结合的紫外差光谱相似,只是最大吸收峰红移至 245 和 296nm,脱铁转铁蛋白不能与 La(Ⅲ)结合。

参 考 文 献

- [1] Messori L., Orioli P., Banholzer V. et al *FEBS. Letters*, **1999**, **442**, 157.
- [2] Aisen P., Leibman A., Zweier J. *J. Biol. Chem.*, **1978**, **253**, 1930.
- [3] Kurokawa H., Mikami B., Hirose M. *J. Mol. Biol.*, **1995**, **254**, 196.
- [4] ZHANG Ai-Ping, YANG Bin-Sheng *Chem. J. Chinese Universities*, **1999**, **20**(7), 1106.
- [5] Marlell A. E., Smith E. M. *Critical Stability Constants*, New York, **1974**, 112.
- [6] YANG Bin-Sheng, Harris W. R. *Acta Chimica Sinica*, **1999**, **57**, 503.
- [7] L'Eplattenier F., Murase I., Martell A. E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, **89**, 837.
- [8] Criohton R. R., Ward R. *J. Biochemistry*, **1992**, **31**, 11255.

UV Difference Spectra Studies on the Binding of La (Ⅲ) and Eu (Ⅲ) to HBED

BAI Hai-Jing LIU Wen YANG Bin-Sheng

(*Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006*)

In 0.01 mol · L⁻¹ N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (Hepes), at room temperature and pH 7.4, the reaction N, N'-Bis(2-hydroxybenzyl) ethylenedinitrilo-N, N'-diacetic acid (HBED) with La (Ⅲ) or Eu (Ⅲ) was monitored by UV difference spectrophotometry. The molar absorptivities for La-HBED and Eu-HBED complexes are $\Delta\epsilon_{La} = (9.82 \pm 0.24) \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$, $\Delta\epsilon_{Eu} = (16.21 \pm 0.12) \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$, respectively. When EDTA was added, the UV difference peak at 238 nm of La-HBED or Eu-HBED decreased. Using EDTA as competing agent conditional equilibrium constants for the complexes were measured. They are $\lg K_{La-HBED} = 11.52 \pm 0.22$ and $\lg K_{Eu-HBED} = 14.16 \pm 0.38$. A linear free energy relationship for the complexes of Lanthanum and Europium has been established by using equilibrium data on 19 complexes produced by these metal ions with low molecular weight ligands. The HBED binding constants for La (Ⅲ) and Eu (Ⅲ) are in agreement with the linear free energy relationship. Under the same conditions the human serum apotransferrin (apoTf) has been titrated with La (Ⅲ), Eu (Ⅲ). The UV difference spectrophotometry for the binding of Eu (Ⅲ) with apoTf is similar to that of Eu (Ⅲ) with HBED, except a little red shift of the maximum absorptivity peaks. The binding of La (Ⅲ) with apoTf, however, hardly happens.

Keywords: transferrin HBED lanthanide ions UV difference spectrophotometry