

茜素红 S-铜(II)金属配合物与溶菌酶作用研究

王兴明

(西南科技大学材料科学与工程学院应用化学研究所, 绵阳 621010)

摘要: 采用 UV-Vis 光谱法研究了 pH=4.25 的缓冲溶液中茜素红 S(ARS)-铜(II)金属配合物与溶菌酶(LYS)的结合反应。提出了双波长物质的量比法和平衡透析物质的量比法, 与单波长物质的量比法进行对照测定研究, 实验结果基本相符。研究发现, ARS-Cu(II)-LYS 的最大吸收波长为 526 nm, 比 ARS 红移 96 nm, 比 ARS-Cu(II)配合物红移 10 nm。在 526 nm 处, 测得 ARS-Cu(II)-LYS 三元配合物的结合比为 $n_{\text{ARS}} : n_{\text{Cu(II)}} : n_{\text{LYS}} = 6 : 3 : 1$, 摩尔吸光系数 $\epsilon = 7.93 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, ARS-Cu(II)配合物与 LYS 作用的条件平衡常数 $K = 3.21 \times 10^{12}$ 。ARS-Cu(II)与 LYS 之间的作用力为配位键和电荷力。

关键词: 双波长物质的量比法; 溶菌酶; 茜素红-铜(II)配合物; 茜素红 S-铜(II)-溶菌酶配合物; UV-Vis 光谱法

中图分类号: O614.121

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2005)03-0315-05

Study on Reaction of Alizarin Red S-Copper(II) Metal Complexes with Lysozyme

WANG Xing-Ming

(Institute of Applied Chemistry, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010)

Abstract: The interaction of Alizarin Red S(ARS)-Copper(II) coordination compound with Lysozyme (LYS) was investigated by UV-Vis spectrophotometric method in acidic buffer solution(pH=4.25). ARS-Cu(II)-LYS was a red color coordination compound having a maximum absorption at 526 nm with 10 nm, 96 nm and 96 nm of red shift compared to the ARS-Cu(II) coordination compound, ARS complex and ARS-LYS complex. Dual wavelength substantial amount ratio method, Balance dialysis substantial amount ratio method and experimentation of unity wavelength substantial amount ratio method were suggested. The apparent substantial amount absorptivity of $7.93 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ was obtained. Combination proportion was defined as $n_{\text{ARS}} : n_{\text{Cu(II)}} : n_{\text{LYS}} = 6 : 3 : 1$. Condition equilibrium constant K of ARS-Cu(II) and LYS was 3.21×10^{12} . It is suggested that combined dint between LYS and ARS-Cu(II) were the coordinate bond and electrostatic force. Contemporary formation of electron transfer complexes is an importance factor in formation of ARS-Cu(II)-LYS Complexes.

Key words: dual wavelength substantial amount ratio method; lysozyme; Alizarin Red S-Copper(II) coordination compound;

Alizarin Red S-Copper(II)-Lysozyme coordination compound; UV-Vis spectra

0 引言

蛋白质(包括酶)的定量在生物化学、临床医学和食品检验等领域具有重要意义^[1-3], 所使用的方法多种多样, 利用有机小分子作为光谱探针测定蛋白质^[4-6]以其简捷、灵敏等优点而被广泛应用。

茜素红 S(ARS)是由天然产物中提取的有机物质, 其和 Cu(II)形成的配合物作为光谱探针与溶菌酶(LYS)相互作用使吸收光谱发生变化。本文对 ARS-Cu(II)与 LYS 的反应机理进行探讨和研究, 提出了双波长物质的量比法和平衡透析物质的量比法, 获得生物大分子与小分子探针反应相互间的结合力、结

收稿日期: 2004-07-26。收修改稿日期: 2004-10-09。

国家自然科学基金资助项目(No.40072020)和四川省教育厅自然科学基金重点资助项目(No.2000-A56)。

E-mail: xmwang_xkd@163.com

作者: 王兴明, 男, 48 岁, 副教授; 研究方向: 生物无机和生物有机制备、分析及机理。

合部位、摩尔吸光系数、结合数和条件结合平衡常数等有关数据及信息。这些研究对于 LYS 的定量测定有重要意义,同时也为进一步了解 LYS 等蛋白质在溶液中的性质奠定了一定的基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

UV-210 型紫外可见光谱仪(日本岛津),UV-210PCS 紫外可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司),PHS-2C 型酸度计(成都方舟科技开发公司),溶菌酶(LYS,上海伯奥生物科技有限公司, $10\,000\text{ u}\cdot\text{mg}^{-1}$, 分析纯),茜素红 S(ARS,天津丽晶化工厂,分析纯),硫酸铜(成都化学试剂厂,分析纯),Britton-Robinson(B-R)系列缓冲溶液(配制方法:准确吸取 2.71 mL 85% 的正磷酸, 2.36 mL 冰乙酸,并称取 2.4700 g 硼酸,用水定容至 $1\,000\text{ mL}$,用 $0.20\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液调节 pH 值)。

1.2 实验方法

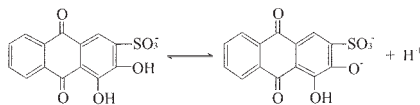
在一系列 10 mL 比色管中,分别加入一定量的 ARS、Cu(II)、LYS 溶液(3 种溶液均分别用系列 B-R 缓冲溶液配制),以相应 B-R 缓冲溶液定容,摇匀,放置 5 min ,以水为参比,扫描吸收光谱。

在一系列 10 mL 比色管中,分别加入一定的量 ARS、Cu(II)、LYS 溶液(3 种溶液均用 $\text{pH}=4.25$ 的 B-R 缓冲溶液配制),以 $\text{pH}=4.25$ 的 B-R 缓冲溶液定容,摇匀,放置 5 min ,应用单波长物质的量比法、双波长物质的量比法、平衡透析物质的量比法等方法,以试剂空白为参比,扫描吸收光谱或测定吸光度。

2 结果与讨论

2.1 吸收光谱与作用机理

ARS 的质子解见下式:



可简记为:



研究 ARS、ARS-LYS、ARS-Cu(II)、ARS-Cu(II)-LYS 在 pH 值为 $2.00\sim 6.50$ 的系列 B-R 缓冲溶液中的吸收光谱(图略),发现随着 pH 值的升高,ARS-Cu(II)-LYS 溶液的最大吸收峰发生红移,由 430 nm 移到 526 nm 处。与只有 ARS、ARS-LYS 及 ARS-Cu(II) 的吸收光谱相比,ARS-Cu(II)-LYS 在 pH 值为

$3.00\sim 5.50$ 范围内出现了新吸收峰。这说明随着溶液酸度的逐渐减小,LYS 与 ARS-Cu(II)相互作用逐渐形成了三元配合物,溶液颜色由黄色向红色逐渐变化。在 pH 值为 $4.00\sim 4.50$ 时,ARS-Cu(II)-LYS 的最大吸收波长均为 526 nm ,与 ARS、ARS-LYS 及 ARS-Cu(II)相比均发生了不同程度的红移。因此,后续实验选择 $\text{pH}=4.25$ 的 B-R 缓冲溶液作为研究介质。 $\text{pH}=4.25$ 的 B-R 缓冲溶液中 ARS-Cu(II)-LYS 的最大吸收波长比 ARS 红移 96 nm ,比 ARS-LYS 红移 96 nm ,比 ARS-Cu(II)红移 10 nm 。根据实验,ARS 与 LYS 作用较微弱,LYS 与游离的 Cu(II)不发生作用,游离的 Cu(II)、游离的 LYS 在实验条件下基本无吸收,如图 1。ARS-Cu(II)-LYS 的最大吸收峰的吸光值比 ARS-Cu(II)增加 0.80 左右,灵敏度大大提高,可用于 LYS 的定量测定。因此,可以认为图 1 吸收曲线 ARS-Cu(II)-LYS 所相应的体系有 ARS-Cu(II)-LYS 三元配合物形成。

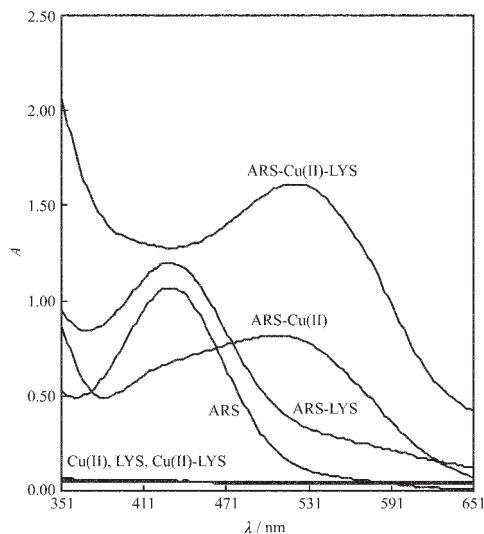


图 1 吸收光谱

Fig.1 Absorption spectra ($\text{pH}=4.25$)

$$C_{\text{ARS}}=0.264\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1};$$

$$C_{\text{Cu(II)}}=0.201\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1};$$

$$C_{\text{LYS}}=24.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$$

ARS-Cu(II)金属配合物与 LYS 形成三元配合物的原因是:在 $\text{pH}=4.25$ 条件下,ARS 主要以 H_2L^- 的形式与 Cu(II)形成 ARS-Cu(II)金属配离子,而 LYS 分子中的精氨酸的胍基、脯氨酸的吡咯基和组氨酸的咪唑基等质子化带正电荷,与 ARS-Cu(II)中带负电荷的磺酸基作用。这种作用是通过静电引力而产生的相互作用,其次则是 LYS 分子与 ARS-Cu(II)金属配合物两者的疏水基团间的相互吸引作用,使两者

接近的程度更大,从而导致静电引力的进一步增强,另一极为重要的原因是 LYS 与 ARS-Cu(II)中的 Cu(II)形成了配位键,因而表现出 ARS-Cu(II)-LYS 的吸光值急剧增加。同时,LYS 分子中的组氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的侧链基团都含有芳香环,是一个环状共轭 π 电子体系,容易与缺电子体系或其他共轭 π 电子体系如 ARS-Cu(II)金属配合物中的苯环形成电子转移配合物。特别是色氨酸含有复杂的 π 电子体系,更容易形成电子转移配合物。因此电子转移配合物的形成,也是 ARS-Cu(II)-LYS 三元配合物的吸收峰增强和红移的原因之一。由于 ARS-Cu(II)-LYS 三元配合物比 ARS-Cu(II)金属配离子只红移了 10 nm,可推测 ARS-Cu(II)与 LYS 分子中的含芳香环残基的作用很弱。

2.2 单波长物质的量比法测定

2.2.1 测定 ARS 与 LYS 的结合比

固定 LYS 溶液的浓度,改变 ARS-Cu(II)溶液的浓度(维持 $n_{\text{ARS}} : n_{\text{Cu(II)}} = 1 : 1.2$,根据实验,此条件下 ARS 已被 Cu(II)全部结合形成金属配合物,可认为无游离的 ARS 存在),在 526 nm 处,以试剂空白作参比测定吸光度,结果如图 2。即在 ARS-Cu(II)-LYS 三元配合物中 ARS 与 LYS 的结合比约为 6 : 1。

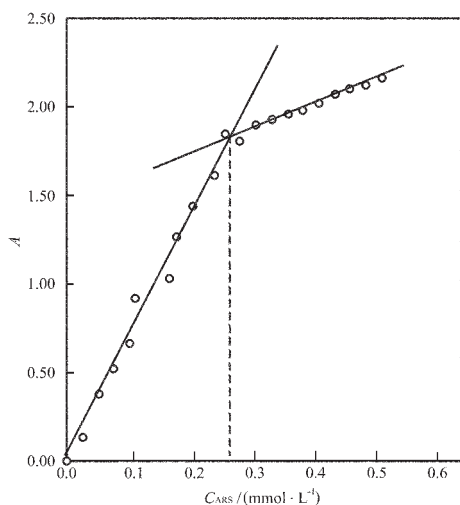


图2 物质的量比法

Fig.2 Substantial amount ratio method (pH=4.25)

$C_{\text{LYS}} = 44.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $n_{\text{ARS}} : n_{\text{Cu(II)}} = 1 : 1.2$

2.2.2 测定 ARS 与 Cu(II)的结合比

固定 ARS 溶液的浓度,改变 Cu(II)-LYS 溶液的浓度($n_{\text{Cu(II)}} : n_{\text{LYS}} = 6 : 1$),在 526nm 处,以试剂空白作参比测定吸光度,结果如图 3。即在 ARS-Cu(II)-LYS 三元配合物中 ARS 与 Cu(II)的结合比约为 2 : 1。

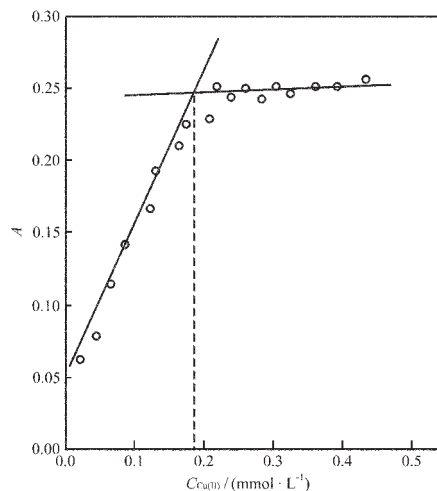


图3 物质的量比法

Fig.3 Substantial amount ratio method (pH=4.25)

$C_{\text{ARS}} = 0.38 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; $n_{\text{Cu(II)}} : n_{\text{LYS}} = 6 : 1$

因此,ARS-Cu(II)-LYS 三元配合物的结合比为 $n_{\text{ARS}} : n_{\text{Cu(II)}} : n_{\text{LYS}} = 6 : 3 : 1$ 。同时,根据 Beer 定律,ARS-Cu(II)-LYS 在溶液中的吸光度可表达为 $A = \varepsilon_c b C_c$ 。式中 ε_c 代表 ARS-Cu(II)-LYS 的摩尔吸光系数, C_c 代表 ARS-Cu(II)-LYS 的浓度,即结合形成此三元配合物的 LYS 的浓度, b 代表比色皿的厚度。因此,根据图 3 计算求得 ARS-Cu(II)-LYS 的摩尔吸光系数 $\varepsilon = 7.93 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

2.3 双波长物质的量比法测定

2.3.1 双波长的确定

固定 LYS 的浓度,逐渐增加 ARS-Cu(II)配合物

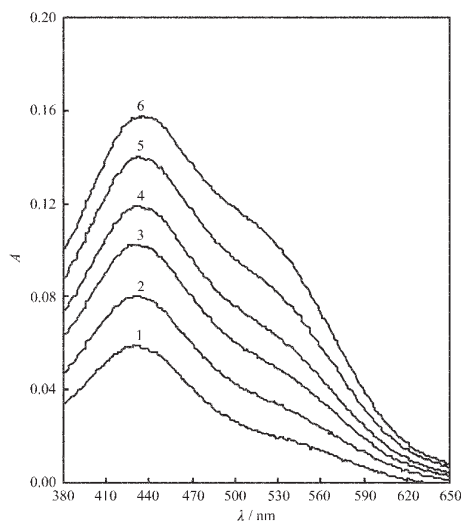


图4 ARS-Cu(II)-LYS 的吸收光谱

Fig.4 Absorption spectra of ARS-Cu(II)-LYS (pH=4.25)
 $C_{\text{LYS}} = 18.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $C_{\text{ARS}}(1 \sim 6) = 19.8, 26.5, 33.1, 39.7, 46.3, 52.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $C_{\text{Cu(II)}}(1 \sim 6) = 29.7, 39.8, 49.7, 59.6, 69.5, 79.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

的浓度,并维持 $n_{\text{ARS}} : n_{\text{Cu(II)}} = 1 : 1.5$,测定各溶液在 380~650 nm 间的吸收光谱。因 Cu(II)与 ARS 的物质的量比为定值,且 ARS 已全部被 Cu(II)结合形成二元配合物,因此加入的 LYS 只能和这种二元配合物结合形成三元配合物,如图 4。随着 ARS-Cu(II)金属配合物浓度减少(图 4 中曲线由 6~1),此时 LYS 过量,而 LYS 和 Cu(II)在此可见光区无吸收,此时的吸收光谱是三元配合物的吸收光谱,它们的吸收峰高虽有变化,但形状基本保持不变,其等吸收双波长趋于恒定(图 4 中曲线 2~1),实验所选择出的等吸收双波长为 $\lambda_1 = 391.0 \text{ nm}$ 和 $\lambda_2 = 471.6 \text{ nm}$ (表 1)。

表 1 等吸收波长

Table 1 Isoabsorption wavelength

Curve No. in Fig.4	λ_1 / nm	A_1	λ_2 / nm	A_2
1	391.0	0.040	471.6	0.040
2	391.0	0.057	471.6	0.057
3	391.0	0.072	471.6	0.079
4	391.0	0.085	471.6	0.094
5	391.0	0.100	471.6	0.115
6	391.0	0.112	471.6	0.135

2.3.2 双波长物质的量比法原理

当 LYS 与过量的 ARS-Cu(II)二元配合物反应时,体系吸光度可以用下式表示:

$$A = \varepsilon_c C_c b + \varepsilon_L C_L b$$

式中: C_c 为溶液中 ARS-Cu(II)-LYS 三元配合物浓度, ε_c 为三元配合物的摩尔吸光系数; C_L 为溶液中游离 ARS-Cu(II)金属配合物浓度, ε_L 为该金属配合物的摩尔吸光系数; b 为比色皿厚度(1 cm)。

如在 ARS-Cu(II)-LYS 配合物等吸收双波长处测定体系吸光度 A_1 和 A_2 ,则:

$$A_1 = \varepsilon_{c_1} C_c + \varepsilon_{L_1} C_L$$

$$A_2 = \varepsilon_{c_2} C_c + \varepsilon_{L_2} C_L$$

$$\Delta A = A_1 - A_2 = (\varepsilon_{c_1} - \varepsilon_{c_2}) C_c + (\varepsilon_{L_1} - \varepsilon_{L_2}) C_L$$

因为,在配合物等吸收双波长处:

$$A_{c_1} = A_{c_2}$$

所以

$$\varepsilon_{c_1} = \varepsilon_{c_2}$$

$$\text{于是 } \Delta A = (\varepsilon_{L_1} - \varepsilon_{L_2}) C_L$$

此关系式说明 ΔA 只与溶液中游离的 ARS-Cu(II)金属配合物浓度有关。作出 ΔA 与 C_L 的等吸收双波长工作曲线,就可以直接求出溶液中游离 ARS-Cu(II)金属配合物的浓度 C_L 。

根据上述讨论,固定 LYS 溶液的浓度,改变 ARS-Cu(II)溶液的浓度(维持 $n_{\text{ARS}} : n_{\text{Cu(II)}} = 1 : 1.5$,根据实验,此条件下 ARS 已被 Cu(II)全部结合形成金属配合物,可认为无游离的 ARS 存在),设计配制 ARS-Cu(II)与 LYS 相比为限量和过量的一系列溶液,测定此系列溶液在等吸收双波长处的吸光度,作出 $\Delta A \sim C_{L_0}$ (或 $\Delta A \sim V_{L_0}$)图, C_{L_0} 为溶液中 ARS-Cu(II)金属配合物的初始浓度。求出 2 条直线交点 A_1 处横坐标浓度 C_{L_0} ,从而可计算 ARS-Cu(II)与 LYS 的结合比。同时,根据图中 A_2 点的吸光度和 ARS-Cu(II)的等吸收双波长工作曲线,可求出 ARS-Cu(II)与 LYS 结合的条件平衡常数 K 。如图 5,求出的 ARS 与 LYS 作用的结合比为 $n = 6 : 1$,即 $n_{\text{ARS}} : n_{\text{Cu(II)}} : n_{\text{LYS}} = 6 : 3 : 1$,二者作用的条件平衡常数为 $K = 3.21 \times 10^{12}$ 。

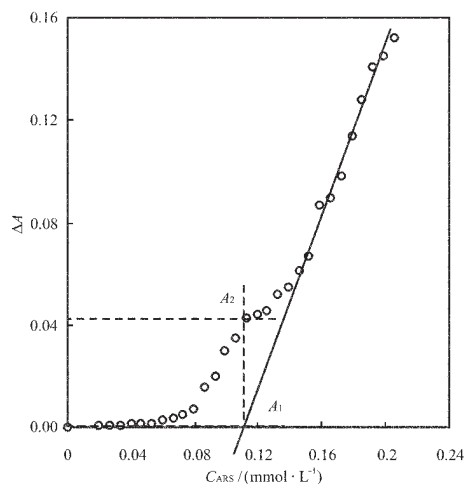


图 5 双波长物质的量比法

Fig.5 Dual wavelength substantial amount ratio method (pH=4.25)

$$C_{\text{LYS}} = 18.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}; n_{\text{ARS}} : n_{\text{Cu(II)}} = 1 : 1.5$$

2.4 平衡透析物质的量比法测定

固定 LYS 溶液的浓度,改变 ARS-Cu(II)金属配合物溶液的浓度,各取配制的溶液 10 mL 加入透析袋中并封闭,置于盛有 50 mL B-R 缓冲溶液的磨口瓶中透析 72 h。以试剂空白为参比,测定透析袋外溶液在 516 nm 处的吸光度,绘制 $A \sim C_{L_0}$ (或 $A \sim V_{L_0}$)图,如图 6。从图 6 可知,在 ARS-Cu(II)配合物的浓度很低时,吸光度变化很小,此时 ARS-Cu(II)配合物被 LYS 结合完全。随着 ARS-Cu(II)配合物浓度的增大,吸光度增大,即透析袋外 ARS-Cu(II)配合物的浓度增大,LYS 被 ARS-Cu(II)配合物结合完全。求出 2 条直线交点 A_1 处横坐标浓度 C_{L_0} ,从而可计算 ARS-Cu(II)与 LYS 的结合比。根据图中 A_2 点的吸光度和

ARS-Cu(II)的单波长工作曲线,可求出 ARS-Cu(II)与 LYS 结合的条件平衡常数。如图 6,求出的 ARS 与 LYS 作用的结合比约为 $n=6:1$, 即 $n_{\text{ARS}}:n_{\text{Cu(II)}}:n_{\text{LYS}}=6:3:1$, 二者相互作用的条件平衡常数为 $K=3.16 \times 10^{12}$ 。

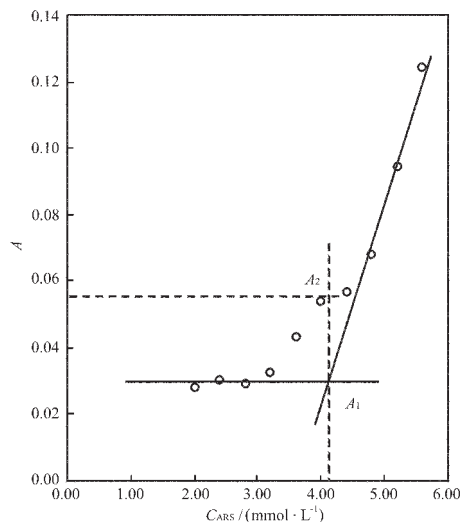


图6 平衡透析物质的量比法

Fig.6 Balance dialysis substantial amount ratio method
(pH=4.5)
 $C_{\text{LYS}}=0.68 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; $n_{\text{ARS}}:n_{\text{Cu(II)}}=1:1.2$

3 结 论

通过单波长物质的量比法、双波长物质的量比法和平衡透析物质的量比法,对 ARS-Cu(II)-LYS 三元配合物的形成机理进行探讨,获得了 ARS-Cu(II)

配合物与 LYS 相互作用的结合比、条件平衡常数、作用部位和作用力等数据和信息,由于双波长物质的量比法消除了背景误差,而平衡透析物质的量比法是直接测定透析袋外游离 ARS-Cu(II)配合物的浓度,因此双波长物质的量比法和平衡透析物质的量比法较单波长物质的量比法更准确可靠。ARS-Cu(II)-LYS 之所以比 ARS-Cu(II)的吸光值强得多,最重要的原因是 LYS 的活性部位中的 2 个羧基 (分别来自第 35 位的谷氨酸残基和 52 位的天冬氨酸残基)、1 个酰氨基和 1 个吡啶基(分别来自第 57 位的谷氨酰胺残基和 63 位的色氨酸残基)、1 个吡啶基和 1 个羧基(分别来自第 62 位的色氨酸残基和 101 位的天冬氨酸残基) 与 ARS-Cu(II)中的 Cu(II)配位形成三元配位化合物。因此 ARS-Cu(II)与 LYS 的相互作用主要是配位键和静电吸引作用。

参考文献:

- [1] Congdon R W, Muth G W, Splittgerber A G. *Anal. Biochem.*, **1993**,**213**:407~413
- [2] Pesavento M, Profumo A. *Talanta.*, **1991**,**38**:1099~1106
- [3] Bradford M M. *Anal Biochem.*, **1976**,**72**:248~254
- [4] Racusen D. *Anal Biochem.*, **1973**,**52**:96~101
- [5] Yutaka S, Atsuko K, Hideki O, et al. *Chem Pharm Bull.*, **1986**,**34**(2):746~750
- [6] WANG Xing-Ming(王兴明), DONG Fa-Qin(董发勤), DING Li-Sheng(丁立生), et al. *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorg. Chem.)*, **2004**,**20**(8):920~924