

稀土芦丁配合物的合成、表征及与血清白蛋白的相互作用

宋玉民* 吴锦绣

(西北师范大学化学化工学院, 兰州 730070)

摘要: 本文合成了稀土元素 La, Pr, Gd 和 Dy 的芦丁配合物, 通过红外光谱、元素分析、热重-差热分析和摩尔电导率等方法对其进行了表征。同时在模拟动物体生理 pH 值条件下, 用荧光光谱法研究了这 4 种配合物与人血清白蛋白(HSA)和牛血清白蛋白(BSA)的结合反应, 结果表明: 配合物对 HSA 和 BSA 都有较强的荧光猝灭作用。通过用 Stern-Volmer 方程处理实验数据发现: HSA 和 BSA 与这 4 种配合物发生了反应, 生成新的复合物, 这种猝灭作用是由于分子内的非辐射能量转移而引起的静态猝灭。用 Scatchard 方程求出了形成复合物的结合常数 K_A 和结合数 n ; 并求得结合过程的热力学参数, 初步确定配合物与血清白蛋白之间主要的作用力是氢键和 Van der Waals 力; 同时用圆二色谱及同步荧光光谱法探讨了配合物对 HSA 和 BSA 构象的影响。

关键词: 稀土芦丁配合物; 牛血清白蛋白; 人血清白蛋白; 荧光光谱; 圆二色谱

中图分类号: O614.33; O614.342

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2006)12-2165-08

Synthesis, Characterization and Interaction of Rare Earth Complexes of Rutin with HSA and BSA

SONG Yu-Min* WU Jin-Xiu

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Northwest Normal University, Lanzhou 730070)

Abstract: The complexes of La, Pr, Gd and Dy rare earth element with rutin were synthesized. On the basis of elemental analysis, thermogravimetric analysis, IR spectra and molar conductance, the general formula of the complexes, $\text{Na}_m\text{RELCl}_n \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\text{L}=\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{O}_{16}$, $\text{RE}=\text{La}$, Pr , $n=10$, $m=8$; $\text{RE}=\text{Gd}$, $n=7$, $m=5$; $\text{RE}=\text{Dy}$, $n=5$, $m=3$), is given. At the same time, under the imitated physiological pH condition of animal body, the binding of complexes to HSA and BSA was studied by fluorescence spectroscopy. It is shown that this compound has a quite strong ability to quench the fluorescence launching from HSA and BSA. According to Stern-Volmer equation and Scatchard equation, it is found that HSA and BSA have reacted with rutin-Pr and formed two systems: rutin-Pr-HSA and rutin-Pr-BSA, respectively. The quenching belongs to static fluorescence quenching, with non-radiation energy transfer within a molecule. According to Scatchard equation, the binding constants K_A (for rutin-Pr-HSA, 295 K: $5.577 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; 310 K: $1.828 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; for rutin-Pr-BSA, 295 K: $2.330 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; 310 K: $7.640 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) and the number of binding sites n (for rutin-Pr-HSA, 295 K: 0.94; 310 K: 1.2; for rutin-Pr-BSA, 295 K: 0.93; 310 K: 1.1); at different temperatures and the thermodynamic parameters (for rutin-Pr-HSA, $\Delta H=-56.54 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 295K: $\Delta G=-32.45 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta S=-81.66 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$; 310 K: $\Delta G=-31.23 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta S=-81.65 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$; for rutin-Pr-BSA, $\Delta H=-56.53 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 295 K: $\Delta G=-30.31 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta S=-88.88 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$; 310 K: $\Delta G=-28.98 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta S=-88.87 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$) at correspondence temperatures were obtained. H-bond and Van der Waals are two main reactions between complexes and HSA (BSA). The effect of complexes on the conformation of HSA and BSA was analyzed by circular dichroism (CD) and synchronous fluorescence spectra.

Key words: rare earth complexes; human serum albumin; bovine serum albumin; fluorescence spectra; circular dichroism spectra

收稿日期: 2006-07-04。收修改稿日期: 2006-09-06。

甘肃省自然科学基金(No.3ZS051-A25-021)和甘肃省高分子材料重点实验室资助项目。

*通讯联系人。E-mail: songym@nwnu.edu.cn

第一作者: 宋玉民, 女, 55 岁, 教授; 研究方向: 生物无机化学。

从分子水平阐述生物大分子与具有生物活性的小分子间的相互作用特征,是生命科学中的核心问题之一。血清白蛋白是血浆中含量最丰富的蛋白质,它不仅对维持渗透压起重要作用,而且能与进入血液中的大多数内源性和外源性物质如药物等进行可逆的结合从而起到在体内转运的作用^[1]。各种药物进入人体一定需要通过血浆的存储和运输,到达受体部位,产生药理作用。研究药物与血清白蛋白的相互作用,对了解药物的作用机制具有重要的意义。因此,从不同角度研究以白蛋白为代表的蛋白质与具有生物活性小分子之间的相互作用,已成为一个非常活跃的研究课题^[2,3]。

芦丁(rutin, 见图 1)分子中 5-羟基和邻二酚羟基,完整的大 π 键共轭体系,强配位氧原子与合适的空间构型,可与金属离子生成配合物。其在临床上主要用于防治脑溢血、高血压、视网膜出血和治疗慢性气管炎等疾病。稀土离子具有抗炎、杀菌、抗癌、抗凝血、镇痛等药理作用^[4]。将两种具有生物活性的物质通过共价键键联,得到一种新型的目标化合物,该化合物能发挥两者的独特性能或协同效应^[5]。

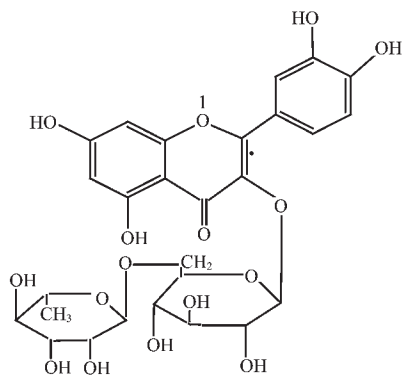


图 1 配体的结构

Fig.1 Structure of ligand

稀土离子与血清白蛋白的相互作用国内外已有报道^[6,7]。本文首次报道了 4 种稀土芦丁配合物 $\text{Na}_m\text{RELCl}_n \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\text{L}=\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{O}_{16}$, $\text{RE}=\text{La}, \text{Pr}, n=10, m=8$; $\text{RE}=\text{Gd}, n=7, m=5$; $\text{RE}=\text{Dy}, n=5, m=3$) 的合成和表征,并在生理 pH 值条件下通过荧光光谱的方法研究稀土芦丁配合物(rutin-Pr)与人血清白蛋白(HSA)和牛血清白蛋白(BSA)之间的相互作用,用 Stern-Volmer 和 Scatchard 方程求得配合物与血清白蛋白的结合常数、结合数、结合作用力类型和热力学参数等;通过圆二色谱和同步荧光光谱法考察了

rutin-Pr 对人血清白蛋白(HSA)和牛血清白蛋白(BSA)构象的影响;并分析了这 4 种稀土配合物与血清白蛋白的作用机理,为今后进一步开发、利用稀土资源及从事稀土生物无机化学、药物化学、生物热化学等领域的研究提供了一些具有理论和应用价值的信息。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

牛血清白蛋白(BSA)为国药集团化学试剂有限公司产品;人血清白蛋白(HSA)为华兰生物工程股份有限公司产品;芦丁(rutin)为 sigma 公司产品; La_2O_3 、 Pr_2O_3 、 Gd_2O_3 、 Dy_2O_3 (纯度 $\geq 99.99\%$, 甘肃稀土公司);配制 $10.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲溶液, $\text{pH}=7.38$ (内含 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的溶液,维持离子强度);实验用水为去离子二次蒸馏水;其余试剂均为分析纯试剂。

Perkin Elmer2400CHN 型元素分析仪;DDS-307 型电导率仪(上海雷磁仪器厂);FTS-3000 型红外光谱仪(KBr 压片);LS-55 荧光分光光度计(美国 PE 公司);J-810 圆二色光谱仪(日本 Jasco 分光公司);DG/DTA-6300 热重-差热分析仪(美国 PE 公司);pHS-25 型酸度计(上海第二分析仪器厂);TB-85 型恒温器(日本岛津公司)。

1.2 稀土芦丁配合物的合成

稀土三价氯化物依据文献^[8]制备,并于硅胶干燥器中保存。另取小块金属钠,置乙醇溶液中溶解得醇钠溶液($\text{pH}=10.00\sim 11.00$)。在装有搅拌器和冷凝管的 50 mL 三口瓶中加入 $0.50 \text{ mmol RECl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 25.00 mL 无水乙醇,加热,搅拌,得澄清溶液,向该溶液中加入芦丁(0.50 mmol),待完全溶解,用醇钠溶液调节溶液 pH 值为 $7.00\sim 8.00$,油浴温控 100°C 回流 6 h,有橘黄色固体析出,抽滤,经热无水乙醇洗涤,直到滤液无色,并取少量滤液在表面皿上滴加 AgNO_3 溶液,至没有白色沉淀为止。将产品放入真空干燥箱中 60°C 下干燥至恒重,产率大于 70%,产品于硅胶干燥器中保存,使用时用少量 DMSO 溶解固体配合物后加入缓冲溶液定容。

1.3 荧光光谱(FS)的测定

室温下,在一系列 10 mL 的比色管中,分别加入 0.5 mL 的 $10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HSA(或 BSA)溶液,然后用微量进样器依次加入不同体积的 rutin-Pr($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)溶液,以 $\text{pH}=7.38$ 缓冲溶液定容至 5 mL,

摇匀后测定荧光光谱、同步荧光光谱。样品池为 1 cm 石英吸收池。

1.4 圆二色谱(CD)的测定

室温下,在一系列 10 mL 的比色管中,分别加入一定体积的 HSA(或 BSA)溶液,然后用微量进样器依次加入不同体积的 rutin-Pr 溶液,以缓冲溶液定容,摇匀后分别测定圆二色谱。以相应的空白溶液为参比。样品池为 1 cm 石英吸收池。

2 结果与讨论

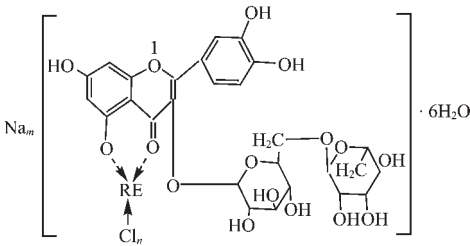
2.1 配合物的表征

2.1.1 元素分析

配体和配合物的 C、H 含量在元素分析仪上测定,稀土离子的含量用 EDTA 法滴定,氯离子的含量用摩尔法滴定。在 22 ℃的 DMSO 溶液中,测得配合物的摩尔电导值在 5.0~11.0 S·cm²·mol⁻¹ 范围,表明配合物在 DMSO 溶液中均属非电解质,氯离子处于配合物的内界,参与配位。

由元素分析数据可知,配合物的组成为 (Na_mRELCl_n·6H₂O),可能结构见图 2。具体数据见表

1。稀土配位数从 La 到 Dy 逐渐减小,这符合镧系收缩原理。



RE=La, Pr, n=10, m=8; RE=Gd, n=7, m=5;
RE=Dy, n=5, m=3

图 2 配合物可能的结构

Fig.2 Possible structure of complex

2.1.2 红外光谱分析

用 KBr 压片法测得配体(C₂₇H₃₀O₁₆)与 4 种稀土-芦丁配合物(La、Pr、Gd、Dy)的红外谱图,配合物的特征吸收基本相似,表明配合物有相似的配位结构。配合物红外谱图与配体的谱图相比发生了较大变化,其主要红外吸收频率及归属列于表 2。

以配合物 rutin-Pr 为例:配体及配合物在 3 400

表 1 配体和配合物的元素分析和摩尔电导值

Table 1 Elemental analysis and molar conductance data for the ligand and complexes

Sample	Elemental Analysis / %				$\Lambda_m / (\text{S} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1})$
	C	H	Cl	RE	
C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ (L)	47.79(47.77)	5.67(5.79)	—	—	4.4
Na ₈ LaLCl ₁₀ ·6H ₂ O	23.40(23.23)	3.16(2.94)	25.82(25.45)	10.17(9.96)	15.63
Na ₈ PrLCl ₁₀ ·6H ₂ O	23.10(23.19)	3.16(2.94)	26.01(25.41)	10.56(10.09)	15.52
Na ₅ GdLCl ₇ ·6H ₂ O	26.85(26.17)	3.65(3.31)	20.14(20.08)	12.98(12.71)	15.62
Na ₃ DyLCl ₅ ·6H ₂ O	28.21(28.77)	3.69(3.64)	16.68(15.76)	15.38(14.43)	10.69

The calculation is in the bracket.

表 2 芦丁及稀土芦丁配合物的主要红外吸收频率 ν 及归属

Table 2 Major IR absorbance and assignments for ligand and complexes (cm⁻¹)

Sample	$\nu_{\text{O-H}}$	$\nu_{\text{C=O}}$	$\nu_{\text{C=C}}$	$\nu_{\text{C-O}}, \delta_{\text{O-H}}$	$\nu_{\text{C-O-C}}$	$\nu_{\text{RE-O}}$
C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ (L)	3 373.54vs	1 655.31v	1 603.01s	1 361.33s	1 203.74s	
			1 504.76s	1 295.90s	1 064.19s	
Na ₈ LaLCl ₁₀ ·6H ₂ O	3 394.71vs	1 625.99m	1 562.69s	1 342.99s	1 203.06s	613.49m
			1 475.54s	1 273.83s	1 069.64s	
Na ₈ PrLCl ₁₀ ·6H ₂ O	3 392.78vs	1 625.43m	1 567.50s	1 350.18s	1 203.41s	617.41m
			1 473.03s	1 274.85s	1 074.85s	
Na ₅ GdLCl ₇ ·6H ₂ O	3 399.26vs	1 621.43m	1 562.34s	1 343.26s	1 205.94s	619.15m
			1 477.47s	1 275.83s	1 074.22s	
Na ₃ DyLCl ₅ ·6H ₂ O	3 399.73vs	1 627.85m	1 560.27s	1 354.76s	1 202.90s	617.35m
			1 492.64s	1 277.23s	1 067.41s	

vs: very strong; s: strong; m: medium.

cm^{-1} 处出现的宽峰为配位水及醇、酚羟基的伸缩振动吸收峰。由于配体分子中带有多个羟基,生成配合物对此峰无影响^[9,10]。配体在 1655.31 cm^{-1} 处出现的羰基伸缩振动吸收峰,由于配位作用使 $\text{C}=\text{O}$ 键减弱,而使配合物相应吸收峰向低波数位移。到 1625.43 cm^{-1} 处,向低波数位移了 30 cm^{-1} ,这说明羰基参与了配位反应^[9,10]。配合物中苯环 π 键共轭体系的 $\text{C}=\text{C}$ 键伸缩振动吸收峰,向低波数方向位移 $31\sim 36 \text{ cm}^{-1}$,是配位反应对苯环共轭体系的影响所致。配体在 1361.33 cm^{-1} 、 1295.90 cm^{-1} 处的 2 个谱峰是酚羟基的 $\text{C}-\text{O}$ 键伸缩振动与 $\text{O}-\text{H}$ 键面内变形振动偶合所致。配合物中这 2 个峰分别向低波数方向位移 11 cm^{-1} 、 19 cm^{-1} ,说明酚羟基参与了配位成键^[9,10]。配体在 $1200\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰是醚的 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 伸缩振动吸收峰,配合物中此峰基本保留在原来的位置,这排除了醚氧原子成键的可能。配合物在 $620\sim 613 \text{ cm}^{-1}$ 处观察到 $\text{RE}-\text{O}$ 键伸缩振动吸收峰,说明配合物中含有 $\text{RE}-\text{O}$ 键。

2.1.3 热重-差热分析

热重-差热分析在氮气气氛中进行,以 Al_2O_3 为参比,以 $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的加热速度从室温加热至 $800 \text{ }^\circ\text{C}$ 。热重-差热分析表明,配体和所有配合物均无确定熔点,配合物的热分解行为彼此相似,说明配合物具有相似结构。在 DTA 曲线上,配合物 $\text{Na}_8\text{LaCl}_{10}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_8\text{PrCl}_{10}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_5\text{GdCl}_7\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_3\text{DyCl}_5\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 分别在 71.1 、 55.7 、 56.3 、 $74.6 \text{ }^\circ\text{C}$ 处各有 1 个小的吸热峰,同时在 TG 曲线上明显反映出失重,失重率分别为 8.60% (8.66%)、 9.90% (8.99%)、 9.76% (9.70%)、 14.2% (14.5%) (括号内为计算值),这些都是配合物的失水峰,都为失去 6 个水分子。鉴于失水温度 $<110 \text{ }^\circ\text{C}$,故该水为结晶水,这与配合物的红外分析结果相一致。

配体的起始分解温度是 $162 \text{ }^\circ\text{C}$,而配合物 $\text{Na}_8\text{LaCl}_{10}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_8\text{PrCl}_{10}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_5\text{GdCl}_7\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_3\text{DyCl}_5\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的起始分解温度分别是: $240.9 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $245.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $301.0 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $307.7 \text{ }^\circ\text{C}$ 。比较配体和配合物的起始分解温度可以看出,配合物的起始分解温度比配体的起始分解温度高,这说明形成配合物后,配体的热稳定性增加。以 $\text{Na}_8\text{PrCl}_{10}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 配合物为例,配合物失去结晶水以后,继续升温,在 $245.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $310.3 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $378.8 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $461.7 \text{ }^\circ\text{C}$ 处出现 4 个放热峰,并伴随有失重,对应于配合物氧化分解。当升温至 $600 \text{ }^\circ\text{C}$ 以上时失重和差热曲线趋于平缓,此时配合物可

认为已完全分解为相应稀土氧化物,总失重(85.9%)与计算值(86.4%)基本相符。

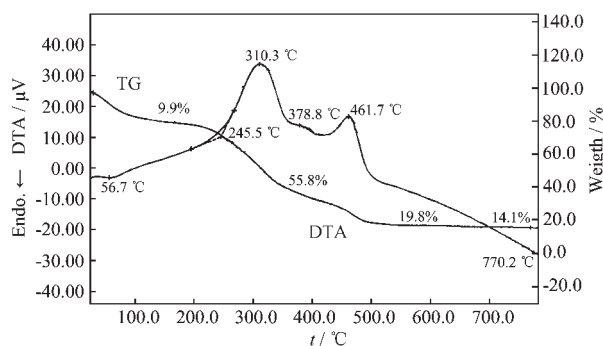


图 3 配合物 rutin-Pr 的热重-差热曲线

Fig.3 TG-DTA curves of the rutin-Pr

2.2 荧光光谱

2.2.1 荧光猝灭光谱和猝灭机理

当激发波长为 280 nm 时,配合物在 $300\sim 500 \text{ nm}$ 范围内无荧光,HSA 和 BSA 由于其自身的色氨酸残基和酪氨酸残基而产生内源荧光。固定 HSA 和 BSA 的量,随配合物浓度的增加(所加的配合物溶液的体积小于 $100 \mu\text{L}$,可忽略稀释效应),HSA 和 BSA 的内源荧光产生有规律的猝灭(以 rutin-Pr 为例,见图 4 和 5),同时使发射波长略蓝移。在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 时的 HSA 和 BSA 荧光猝灭光谱与 $22 \text{ }^\circ\text{C}$ 时的相似,最大荧光发射峰的位置未变。据文献报道^[11],HSA 和 BSA 的构象不随温度的变化而变化,所以在所测温度下不需要考虑 HSA 和 BSA 构象的变化。

荧光猝灭过程通常可以分为动态猝灭和静态猝灭^[12]。动态猝灭是猝灭剂和荧光物质的激发态分子之间的相互作用过程。其作用过程遵循 Stern-Volmer 方程:

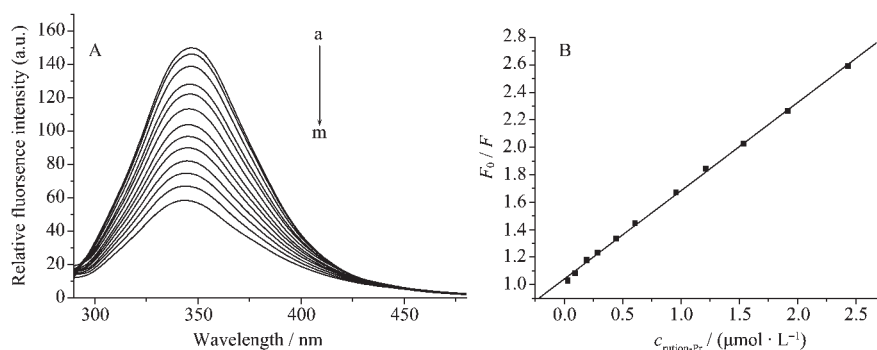
$$F_0/F = 1 + K_q\tau_0c_Q = 1 + K_{SV}c_Q \quad (1)$$

其中 F_0 为未加猝灭剂时的荧光强度; F 为加入猝灭剂后的荧光强度; K_q 为双分子猝灭过程的速率常数; τ_0 为没有猝灭剂存在时荧光分子的平均寿命; K_{SV} 称为 Stern-Volmer 猝灭常数,是双分子猝灭速率常数与单分子衰变速率常数的比率; c_Q 为猝灭剂的浓度。

静态猝灭是猝灭剂和荧光物质分子在基态时生成不发光的配合物,从而导致荧光物质荧光强度降低的过程,此过程可用下式描述:

$$F_0/F = 1 + Kc_Q \quad (2)$$

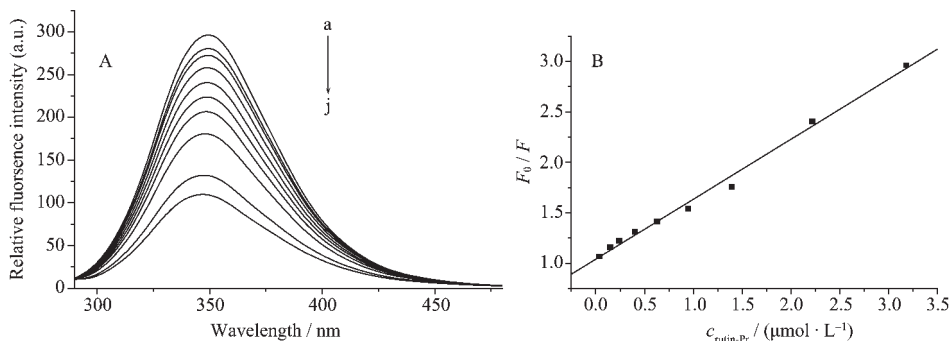
式中 F_0 、 F 和 c_Q 与(1)式相同, K 是基态配合物的形成常数。



295 K; $\lambda_{ex}=280$ nm; $\lambda_{em}=348$ nm; $c_{HSA}=1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; A: from a to m curves $c_{\text{rutin-Pr}} / (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: 0, 0.032, 0.096, 0.192, 0.288, 0.448, 0.608, 0.768, 0.960, 1.216, 1.536, 1.920, 2.432, respectively; B: Plot of F_0/F vs $c_{\text{rutin-Pr}}$

图 4 rutin-Pr 对 HSA 溶液的荧光光谱的影响

Fig.4 Emission spectra of HSA in the presence and absence of rutin-Pr



295 K, $\lambda_{ex}=280$ nm; $\lambda_{em}=348$ nm; $c_{BSA}=1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; A: from a to j curves $c_{\text{rutin-Pr}} / (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: 0, 0.038, 0.147, 0.243, 0.403, 0.627, 0.947, 1.396, 2.220, 3.180, respectively; B: Plot of F/F_0 vs $c_{\text{rutin-Pr}}$

图 5 rutin-Pr 对 BSA 溶液的荧光光谱的影响

Fig.5 Emission spectra of BSA in the presence and absence of rutin-Pr

比较式(1)和式(2)可以看到,无论是静态猝灭还是动态猝灭, F_0/F 与 c_Q 之间存在着线性关系(见表3)。各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞速率常数为 $2.000 \times 10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ^[13], τ_0 为无猝灭剂时荧光分子的平均寿命,生物大分子的荧光平均寿命约为 10^{-8} s ^[13]。从表4可看出,rutin-Pr对HSA和BSA荧光的猝灭过程速率常数都远远大于最大扩散控制的速率常数,可以初步判断 rutin-Pr对HSA和BSA荧光的猝灭过程可能是属于生成复合物的静态猝灭。

动态与静态猝灭也可依据不同温度下的猝灭常数得以区别。对动态猝灭,随着温度的升高,将增加离子有效碰撞数目,加剧电子的转移,使荧光物种的猝灭常数随温度的升高而增大;若是静态猝灭,则温度升高将降低缔合物的稳定性,使猝灭常数减小。表4中,动态猝灭常数 K_{sv} 随着温度的升高而减小了,这表明 rutin-Pr对HSA和BSA的荧光猝灭作用不是由扩散和碰撞引起的动态猝灭,而是生

成了 rutin-Pr-HAS(BSA)复合物的静态猝灭。

2.2.2 HSA 和 BSA 与 rutin-Pr 的结合常数和荧光能量转移

药物分子和蛋白质分子间的相互作用一般采用位点结合模型来描述^[3],设结合常数为 K_A ,依据 Scatchard 方程^[14]:

$$F_0/F = K_A c_Q F_0 / (F_0 - F) - n K_{ACP} \quad (3)$$

c_Q 为猝灭剂的浓度, c_P 为蛋白质的浓度。当 c_P 固定不变, c_Q 变化时,按照式(1)和(3)对实验数据进行处理,并对实验数据线性拟合得到直线方程、相关系数和结合数(见表3、4)。

当温度变化不大时,结合反应的焓变 ΔH 可看成一个常数,由以下热力学公式可求得有关参数(见表4)。

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K \quad (5)$$

从表4中可知结合常数 K_A 较大,进一步证明

表 3 线形回归方程和相关系数

Table 3 Regression equations and correlation coefficient

	T / K	Regression equation	R	n
HSA	295	$F_0/F=1.039+6.435 \times 10^5 c_Q$	0.999 5	—
	310	$F_0/F=1.052+5.746 \times 10^5 c_Q$	0.992 5	—
	295	$F_0/F=5.577 \times 10^5 c_{\text{rutin-Pr}} F_0/(F_0-F)-0.524 2$	0.999 6	0.94
	310	$F_0/F=1.828 \times 10^5 c_{\text{rutin-Pr}} F_0/(F_0-F)-0.219 4$	0.990 2	1.2
BSA	295	$F_0/F=1.039+5.949 \times 10^5 c_Q$	0.996 4	—
	310	$F_0/F=1.049+4.912 \times 10^5 c_Q$	0.993 8	—
	295	$F_0/F=2.330 \times 10^5 c_{\text{rutin-Pr}} F_0/(F_0-F)-0.216 7$	0.999 7	0.93
	310	$F_0/F=7.640 \times 10^4 c_{\text{rutin-Pr}} F_0/(F_0-F)-0.084 04$	0.995	1.1

表 4 结合反应常数和热力学参数

Table 4 Binding constants and thermodynamic parameters

	T / K	$K_{SV} / (L \cdot mol^{-1})$	$K_q / (L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1})$	$K_A / (L \cdot mol^{-1})$	$\Delta H / (kJ \cdot mol^{-1})$	$\Delta S / (J \cdot K^{-1})$	$\Delta G / (kJ \cdot mol^{-1})$
HSA	295	6.435×10^5	6.435×10^{13}	5.577×10^5	-56.54	-81.66	-32.45
	310	5.746×10^5	5.746×10^{13}	1.828×10^5	-56.54	-81.65	-31.23
BSA	295	5.949×10^5	5.949×10^{13}	2.330×10^5	-56.53	-88.88	-30.31
	310	4.912×10^5	4.912×10^{13}	7.640×10^4	-56.53	-88.87	-28.98

配合物与血清白蛋白的作用是属于静态荧光猝灭。从热力学角度来看,反应的 $\Delta G < 0$, 证明该结合反应能够自发进行;反应的 $\Delta H < 0$, 为放热反应, 升高温度将不利于其向生成 rutin-Pr-HSA(BSA)复合物的方向进行。这与静态猝灭常数显示的 310 K 时的 K_A 值比 295 K 时的 K_A 值小相一致。

荧光能量转移可分为辐射能量转移和非辐射能量转移。若发生辐射能量转移,会导致物质的荧光光谱畸形。图 4 和 5 中可看出 HSA 和 BSA 的荧光光谱都没有畸变,因此 HSA(BSA)与配合物之间的能量转移不应为辐射能量转移。非辐射能量转移包括分子内能量转移和分子间能量转移。若供能体与受能体结合生成了复合物,则两者之间的能量转移为分子内能量转移,否则为分子间能量转移。由上述分析可知,HSA(BSA)与配合物之间的能量转移应属于分子内的非辐射能量转移。

2.3 结合力类型

有机小分子和蛋白质等生物大分子之间的结合力主要有疏水作用力、氢键、Van der Waals 力和静电引力等。不同分子与蛋白质结合力的类型是不同的。Ross^[15]等根据大量的实验结果,总结出了判断生物大分子与小分子结合力性质和生物大分子自身结合力性质的热力学规律,即疏水作用力有可能使体系的 ΔH 和 ΔS 增大,氢键或者 Van der Waals 力有可能使体系的 ΔH 和 ΔS 减小,静电作用力使

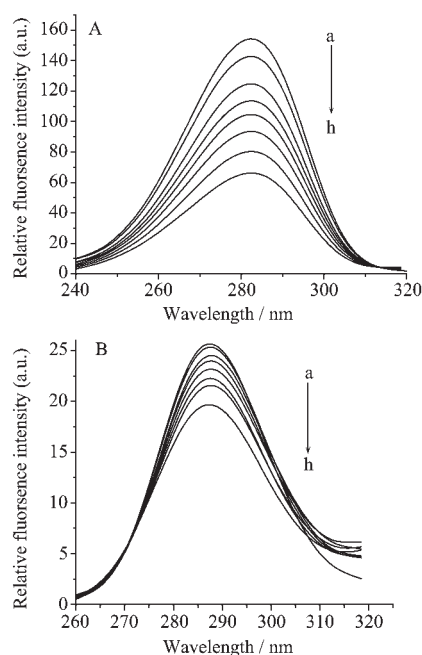
$\Delta H \approx 0, \Delta S > 0$ 。由表 4 所列数据可以认为,配合物与 HSA(BSA) 之间的作用力主要是氢键和 Van der Waals 力。

2.4 HSA 和 BSA 构象变化

2.4.1 同步荧光光谱

固定激发波长和发射波长的间距 $\Delta\lambda$, 同步扫描激发和发射单色器可得同步荧光光谱,这种光谱已被用于蛋白质构象变化的分析^[12]。对于蛋白质的同步荧光光谱, $\Delta\lambda=15$ nm 时只表现出酪氨酸残基的荧光, $\Delta\lambda=60$ nm 时仅表现出色氨酸残基的荧光^[12]。因为氨基酸残基的最大发射波长与其所处环境的疏水性有关,所以由发射波长的改变可判断蛋白质构象的变化。

HSA 和 BSA 的空间结构由 3 个结构域组成,每个结构域由 2 个亚结构域以槽口相对的方式形成圆筒状结构,几乎所有疏水性氨基酸残基都包埋在圆筒内部,构成疏水腔^[16]。室温(22 °C),固定 HSA 和 BSA 浓度,逐渐增大配合物的浓度,记录 $\Delta\lambda=60$ nm 和 $\Delta\lambda=15$ nm 时的同步荧光光谱(图 6,BSA 的同步荧光光谱与 HSA 相似)。发现在 HSA 和 BSA 的同步荧光光谱中,酪氨酸残基的最大发射波长都蓝移,而色氨酸残基的最大发射波长都红移。表明配合物的加入使 HSA 和 BSA 的构象都发生变化,酪氨酸残基所处环境的疏水性增加,而色氨酸残基所处环境的疏水性降低,配合物分子的结合部位可能都处于



A: $\Delta\lambda = 60$ nm; B: $\Delta\lambda = 15$ nm; $c_{\text{HSA}} = 1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
from a to h curves $c_{\text{rutin-Pr}} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 0, 0.038, 0.102, 0.422, 0.678, 0.998, 1.510, 2.278, respectively

图 6 rutin-Pr 对 HSA 的同步荧光光谱的影响

Fig.6 Synchronous fluorescence spectra of HSA

这种疏水腔中,使 HSA 和 BSA 内部的疏水结构有所瓦解,肽链的伸展程度增加^[17]。

2.4.2 圆二色谱(CD)

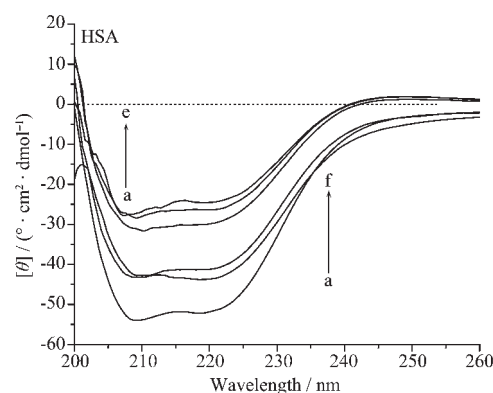
HSA 与 BSA 是光学活性物质,因此可测量它们的 CD 谱,从而了解其构象(结构),当加入配合物后,观察其结构的变化。一般 CD 谱用椭圆值 $[\theta]$ ^[18]表示,若使用单位浓度与单位光程长度,则 $[\theta]$ 可表示为:

$$[\theta] = 3300(A_L - A_R) \quad (6)$$

单位为“ $^{\circ} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ”, A_L 和 A_R 分别为物质对入射的左旋和右旋偏振光的吸收率。

图 7 所示,随着配合物 rutin-Pr 浓度的增加, HSA 分子典型二级结构的 208 nm 和 222 nm 处的负峰略微移向低波数并且振幅显著减弱。说明配合物 rutin-Pr 与 HSA 的肽键形成配位键,使 HSA 肽链伸展,改变了 HSA 的二级结构,导致 α -螺旋结构的减少^[19,20],这与同步荧光光谱分析的结果相一致。当配合物 rutin-Pr 浓度增大到 $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时(图 7c), 208 nm 处负峰的振幅增大,而 222 nm 处负峰的振幅继续减小,说明此时部分降解后的 HSA 分子在组成和结构上都发生了变化,很可能发生了断链。

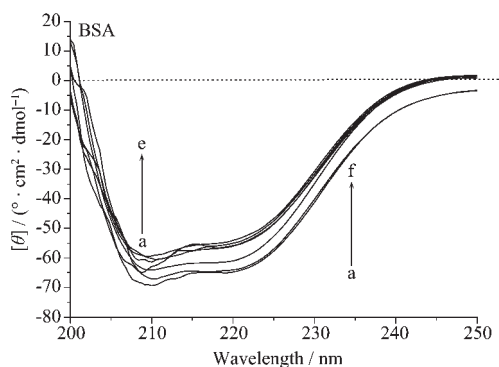
如图 8 所示,随着 rutin-Pr 浓度的增加,BSA 分子典型二级结构的 208 nm 和 222 nm 处的负峰振



295 K, $c_{\text{HSA}} = 0.77 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, from a to f curves $c_{\text{rutin-Pr}} / (\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$: 0, 24, 40, 56, 72, 88, respectively

图 7 rutin-Pr 对 HSA 溶液的 CD 光谱的影响

Fig.7 Effect of rutin-Pr on the CD spectra of HSA solution



295 K, $c_{\text{BSA}} = 0.77 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, from a to g curves $c_{\text{rutin-Pr}} / (\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$: 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, respectively

图 8 rutin-Pr 对 BSA 溶液的 CD 光谱的影响

Fig.8 Effect of rutin-Pr on the CD spectra of BSA solution

幅逐渐降低。说明 BSA 的二级结构中 α -螺旋含量不断减少^[20,21]。当 rutin-Pr 浓度增大到 $72 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时(图 8d),峰型发生变化,208 nm 处负峰的振幅增大,而 222 nm 处负峰的振幅继续减小,说明此时部分降解后的 BSA 分子在组成和结构上都发生了变化,很可能发生了断链。进一步增大浓度,两个峰的振幅不减反增,说明断链后的 BSA 分子发生收缩, α -螺旋含量有所增加,但达不到原来的水平(图 8g)。

3 结 论

通过观察配合物对血清白蛋白的荧光猝灭,由图 4、5 的猝灭直线看出,血清白蛋白在低浓度范围都呈良好的线性关系,相关系数分别为 0.999 5 (HSA)和 0.996 4 (BSA),且配合物对 HSA 和 BSA 荧光的猝灭过程属于静态荧光猝灭,且发生分子内的非辐射能量转移。同步荧光光谱图表明,酪氨酸残

基的最大发射波长都蓝移,而色氨酸残基的最大发射波长都红移。而 HSA(图 4A)和 BSA(图 5A)荧光发射最大发射波长都蓝移,且蓝移程度远大于酪氨酸残基。这是因为除了蛋白质构象的影响,随色氨酸荧光被猝灭,及色、酪氨酸两残基间的能量传递受阻,使 HSA 和 BSA 渐渐体现出原来被掩盖的酪氨酸短波长的荧光,故而观察到较明显的波长蓝移。它们之间的作用力主要是氢键和 Van der Waals 力。CD 光谱(图 7 和图 8),说明随稀土配合物浓度增加破坏 HSA 和 BSA 的二级结构,主要是配合物通过氢键和 Van der Waals 力与肽链形成配位键,使蛋白质肽链先伸展后收缩。这说明稀土配合物对白蛋白的构象和分子能级都有明显作用,很可能稀土配合物是一类具有明显的抗菌、抗病毒、促凝血等活性的药物。

参考文献:

- [1] HU Yan-Jun(胡艳军), LIN Yi(刘义), HOU An-Xin(侯安新), et al. *Huaxue Xuebao(Acta Chim. Sinica)*, **2004**,**62**:1519~1523
- [2] Ulrich K H. *Pharmacol Rev.*, **1981**,**33**:17~23
- [3] HUANG Po(黄波), ZOU Guo-Lin(邹国林), YANG Tian-Ming(杨天鸣). *Huaxue Xuebao(Acta Chim. Sinica)*, **2002**,**60**:1867~1871
- [4] YAN Yi-Xin(杨一心), WANG Yan(王艳), ZHAO Tian-Cheng(赵天成), et al. *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese Journal of Inorganic Chemistry)*, **2005**,**21**(4):578~582
- [5] JIA Tao(贾涛), WANG Kai(王凯), BAO Xiao-Ping(鲍小平), et al. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao (Chemical Journal of Chinese Universities)*, **2004**,**25**(9):1604~1607
- [6] LIANG Hong(梁宏), BIAN He-Dong(边贺东), TU Chu-Qiao(涂楚桥), et al. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao (Chemical Journal of Chinese Universities)*, **2001**,**22**(1):21~25
- [7] LI Xiao-Jing(李晓晶), ZHANG Shan-Rong(张善荣), ZHANG Shu-Gong(张树荣), et al. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao (Chemical Journal of Chinese Universities)*, **1999**,**20**(1):127~131
- [8] HU Ming(胡明), ZHAO Yong-Liang(赵永亮). *Huaxue Yanjiu Yu Yingyong(Chemical Research and Application)*, **2001**,**13**(5):560~562
- [9] YANG Mei-Ling(杨美玲), YANG Pei-Ju(杨培菊), SONG Yu-Min(宋玉民). *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese Journal of Inorganic Chemistry)*, **2005**,**21**(4):483~489
- [10] ZHAO Yao-Xing(赵瑶兴), SUN Xiang-Yu(孙祥玉). *Spectrum Identification of Organic Molecular Structure(有机分子结构光谱鉴定)*. Beijing: Science Press, **2003**.72~82
- [11] LI Lian-Shan(李连山), LI Xiao-Yan(李晓燕). *Fenxi Shiyanshi (Chinese Journal of Analysis Laboratory)*, **2005**,**24**(4):20~23
- [12] CHEN Gong-Zhen(陈国珍). *Fluorescence Analytical Method (荧光分析法)*. Beijing: Science Press, **1990**.122~189
- [13] XIE Meng-Xia(谢孟峡), XU Xiao-Yun(徐晓云), WANG Ying-Dian(王英典), et al. *Huaxue Xuebao (Acta Chim. Sinica)*, **2005**,**63**:2055~2062
- [14] Scatchard G, Scheinberg I H, Armstrong S H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**,**72**:535~537
- [15] Ross D P, Subramanian S. *Biochemistry*, **1981**,**20**:3096~3103
- [16] ZHANG Bao-Lin(张保林), WANG Wen-Qing(王文清), YUAN Rong-Yao(袁荣尧), et al. *Huaxue Xuebao (Acta Chim. Sinica)*, **1994**,**52**:1213~1217
- [17] ZHANG Xiao-Wei(张晓威), ZHAO Feng-Lin(赵凤林), LI Ke-An(李克安). *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao(Chemical Journal of Chinese Universities)*, **1999**,**20**(7):1063~1067
- [18] YANG Pin(杨频), GAO Fei(高飞). *Theory of Bioinorganic Chemistry(生物无机化学原理)*. Beijing: Science Press, **2002**.345~354
- [19] ZHANG Zhao-Hong(张朝红), ZANG Shu-Liang(藏树良), GENG Bing(耿兵), et al. *Fenxi Kexue Xuebao(Chin. Journal of Analytical Science)*, **2005**,**21**(2):179~181
- [20] SHEN Xing-Chan(沈星灿), LIANG Hong(梁宏), HE Xi-Wen(何锡文), et al. *Fenxi Xuaxue(Chin. J. Anal. Chem.)*, **2004**,**23**(3):388~394
- [21] Kelly S M, Price N C. *Biochem. Biophys. Acta*, **1997**,**161**:1338~1344