

三种钴乙醇酸配合物与牛血清白蛋白相互作用的荧光分析

林海彬^{*,1} 周朝晖² 王庆华¹ 汪庆祥¹

(¹ 闽南师范大学化学与环境科学系,福建省现代分离分析科学与技术重点实验室,漳州 363000)

(² 固体表面物理化学国家重点实验室,厦门 361005)

摘要: 利用溶液法合成了 3 种钴乙醇酸配合物,并对配合物 $cis-[Co_2(Hgly)_4(2,2'-bpy)_2]$ ($Hgly=glycolic\ acid, 2,2'-bpy=2,2'$ -bipyridine)(**3**)进行了 X-射线单晶衍射表征,结果表明:该配合物为三斜晶系,空间群为 $P2_1/c$, $a=1.003\ 7(3)\ nm, b=2.022\ 6(5)\ nm, c=1.660\ 1(4)\ nm, \beta=119.942(13)^\circ, V=2.920\ 3(13)\ nm^3$ 。利用荧光光谱法分别研究了室温下这 3 种配合物与 BSA 相互作用的结果,并测定了不同温度下配合物 **2** 和 **3** 与牛血清白蛋白相互作用的荧光强度的变化,确定了配合物 **2** 和 **3** 对牛血清白蛋白的荧光淬灭方式均为静态淬灭;同时分析了这两种配合物与牛血清白蛋白相互作用时的结合常数、结合位点数以及热力学函数与温度变化之间的关系,进一步讨论了这两种配合物分别与 BSA 相互作用时的作用力类型。综合以上结果表明:当分别含有邻菲咯啉和 2,2'-联吡啶配体的配合物与 BSA 相混合时,它们都能与 BSA 相互作用,且主要的作用力都是氢键和范德华力,但它们对蛋白质中色氨酸的构象或其周围环境的影响却是不同的。

关键词: 钴离子;乙醇酸;牛血清白蛋白;荧光光谱

中图分类号: O614.4; O614.81*3

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2014)07-1559-08

DOI: 10.11862/CJIC.2014.168

Interaction Between Three Cobalt(II) Glycollates and Bovine Serum Albumin Studied by Fluorescence Spectrum

LIN Hai-Bin^{*,1} ZHOU Zhao-Hui² WANG Qing-Hua¹ WANG Qing-Xiang¹

(¹Department of Chemistry, Fujian Province University Key Laboratory of Analytical Science, Minnan Normal University, Zhangzhou, Fujian 363000, China)

(²State Key Laboratory for Physical Chemistry of Solid Surface, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: Three neutral complexes of cobalt(II) glycollates had been synthesized in the solution, in which $cis-[Co_2(Hgly)_4(2,2'-bpy)_2]$ (**3**) ($Hgly=glycolic\ acid, 2,2'-bpy=2,2'$ -bipyridine) was characterized by X-ray structural analysis. It crystallized in the triclinic system, space group $P2_1/c$, $a=1.003\ 7\ (3)\ nm, b=2.022\ 6\ (5)\ nm, c=1.660\ 1(4)\ nm, \beta=119.942(13)^\circ, V=2.920\ 3\ (13)\ nm^3$. The interaction between bovine serum albumin (BSA) and complexes **1~3** had been investigated with fluorescence spectra at room temperature respectively. The fluorescence quenching was shown as static quenching for **2** and **3** based on fluorescence spectra at the different temperatures. The binding constants, binding sites and thermodynamic functions were calculated. The interaction sites and binding force of BSA with complexes **2** and **3** were proposed. These results showed that when the complexes containing phenanthroline and 2,2'-bipyridine interacted with BSA respectively, the ligands of 1,10-phenanthroline and the 2,2'-bipyridine both perturbed the microenvironment close to tryptophan residues of BSA, but the effects were different.

Key words: cobalt(II); glycolic acid; BSA; fluorescence spectrum

收稿日期: 2013-12-01。收修改稿日期: 2013-12-25。

国家自然科学基金资助项目(No.21275127), 福建省教育厅基金(No.JA12216)。

*通讯联系人。E-mail: linhb_97@mnnu.edu.cn, Tel: 0596-2591445

0 引言

近年来,随着分子生物学和生物无机化学的快速发展,人们从细胞层次、基因层次及分子层次上逐步认识到金属离子或小分子化合物在生物体内的重要生物功能,如生物电子传递、生物化学事件的调控、酶活性中心等^[1-5]。而血清白蛋白是血浆中最为丰富的蛋白质,它能与许多内源及外源性化合物结合,起到储存与转运的作用^[6]。因此通过研究生物小分子与血清白蛋白的相互作用,从而从分子水平推测生物大分子与具有生物活性的小分子间的相互作用特征,已成为一个非常活跃的研究课题^[7-8]。在前文中,我们曾经利用紫外光谱、红外光谱和荧光光谱法研究了一系列钴和镍配合物与牛血清白蛋白(BSA=Bovine Serum Albumin)的相互作用^[9-11]。本文通过合成3个不同结构的配合物 $[\text{Co}(\text{Hgly})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\mathbf{1})$, $[\text{Co}(\text{Hgly})_2(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}(\mathbf{2})$ 和 $\text{cis}-[\text{Co}_2(\text{Hgly})_4(2,2'\text{-bpy})_2](\mathbf{3})$ (Hgly=glycolic acid, phen=1,10-phenanthroline, 2,2'-bpy=2,2'-bipyridine),利用荧光光谱法和紫外光谱法分析了它们与牛血清白蛋白相互作用的结果,从而为探讨配合物中结构的差异性对它们与牛血清白蛋白相互作用时的影响提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

乙醇酸(化学纯,汕头市西陇化工厂有限公司);氯化钴(分析纯,汕头市西陇化工厂有限公司);牛血清白蛋白(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);邻菲咯啉(分析纯,汕头市西陇化工厂有限公司);2,2'-联吡啶(分析纯,汕头市西陇化工厂有限公司)。

红外光谱在 Nicolet FT-IR360 型红外光谱仪测试;单晶结构测定在 Bruker Apex CCD 单晶衍射仪上完成;荧光光谱的测定在 RF-540 型荧光分光光度计上完成。

1.2 实验方法

1.2.1 配合物 $[\text{Co}(\text{Hgly})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\mathbf{1})$ 的合成

根据文献^[12]:将 10.0 mmol $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于 20 mL 蒸馏水中,搅拌至完全溶解,得到溶液(1);将 20.0 mmol 乙醇酸溶于 10 mL 的水溶液中,并用氢氧化钠调节溶液的 pH 值约为 7.0,得溶液(2);将溶液(2)加入溶液(1)中,搅拌 0.5 h 后,于室温下静置数天,析出粉红色晶体,产率 66.2%。对该晶体进行元素分析及红外表征,测定值(%): C, 19.7; H, 4.1. 理论

值(%): C, 19.6; H, 4.1. IR (KBr, cm^{-1}): 986_{as}(COO) 1 592_{vs}; $\nu_s(\text{COO})$ 1 428_m, 1 403_m, $\nu_s(\text{Co-O})$ 769_m, 680_m, 559_m。

1.2.2 配合物 $[\text{Co}(\text{Hgly})_2(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}(\mathbf{2})$ 的合成

根据文献^[13]:将 10.0 mmol $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 10.0 mmol 1,10-phen 溶于 20 mL 蒸馏水中,搅拌至完全溶解,得到溶液(1);将 20.0 mmol 乙醇酸溶于 10 mL 的水溶液中,并用氢氧化钠调节溶液的 pH 值约为 7.0,得溶液(2);将溶液(2)加入溶液(1)中,搅拌 0.5 h 后,于室温下静置数天,析出棕色晶体,产率 43.0%。对该晶体进行元素分析及红外表征,测定值(%): C, 45.4; H, 4.2; N, 6.9. 理论值(%): C, 45.2; H, 4.2; N, 6.6. IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{as}(\text{COO})$ 1 602_{vs}; $\nu_s(\text{COO})$ 1 423_s, 1 403_s; $\delta_{\text{phen}}(\text{C-H})$ 851_s; $\nu_s(\text{Co-O})$ 723_m, 691_w, 524_w; $\nu_s(\text{Co-N})$ 610_w。

1.2.3 配合物 $\text{cis}-[\text{Co}_2(\text{Hgly})_4(2,2'\text{-bpy})_2](\mathbf{3})$ 的合成

将 10.0 mmol $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 10.0 mmol 2,2'-bpy 溶于 20 mL 蒸馏水中,搅拌至完全溶解,得到溶液(1);将 20.0 mmol 乙醇酸溶于 10 mL 的水溶液中,并用氢氧化钠调节溶液的 pH 值约为 7.0,得溶液(2);将溶液(2)加入溶液(1)中,搅拌 0.5 h 后,于室温下静置数天,析出棕色晶体,产率 39%。对该晶体进行元素分析及红外表征,测定值(%): C, 46.6; H, 4.2; N, 7.9. 理论值(%): C, 46.0; H, 3.8; N, 7.7. IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{as}(\text{COO})$ 1 571_{vs}; $\nu_s(\text{COO})$ 1 443_s, 1 400_s; $\delta_{\text{bpy}}(\text{C-H})$ 768_s; $\nu_s(\text{Co-O})$ 738_m, 707_w, 555_w; $\nu_s(\text{Co-N})$ 590_w。

1.2.4 配合物 $\mathbf{1}\sim\mathbf{3}$ 与 BSA 相互作用的荧光测定

用 Tris-HCl 缓冲溶液(pH=6.8)配制浓度为 $1.0\times 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 BSA 溶液,然后于一系列 10.00 mL 容量瓶中加入 1.00 mL BSA 溶液,并分别加入不同体积的配合物 $\mathbf{1}\sim\mathbf{3}$ 溶液,定容,以 $\lambda=280\text{ nm}$ 为激发波长,记录 300~400 nm 范围的荧光光谱;然后将该系列溶液分别于 25.0, 30.0, 35.0 和 40.0 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 5 min 后,以 $\lambda=280\text{ nm}$ 为激发波长,记录 300~400 nm 范围的荧光光谱。并测定室温时,配合物 $\mathbf{2}$ 和 $\mathbf{3}$ 与 BSA 相互作用时在 $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 的同步荧光光谱。

1.2.5 配合物 $\mathbf{2}$ 和 $\mathbf{3}$ 与 BSA 相互作用的紫外测定

用 pH 值为 6.8 的 Tris-HCl 缓冲溶液配制浓度为 $1.0\times 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA 溶液,然后于一系列 10.00 mL 容量瓶中分别加入一定体积的配合物 $\mathbf{2}$ 和 $\mathbf{3}$ 溶液,再分别加入不同体积的 Tris-HCl 缓冲溶液(pH=6.8),定容。分别用同等浓度的配合物 $\mathbf{2}$ 和 $\mathbf{3}$ 为参

比,测定200~400 nm 范围的紫外光谱。

2 结果与讨论

2.1 配合物 3 的结构分析

选取 0.56 mm×0.33 mm×0.15 mm 大小的棕色晶体,用 Bruker SMART APEX II CCD 单晶衍射仪收集衍射数据,在温度 293(2) K 下用经过石墨单色化的 Mo 射线作为入射辐射,以变速扫描方式在 $1.74^\circ \leq \theta \leq 28.37^\circ$ 范围内共收集 13 899 个衍射数据,其中独立衍射数据 5 092 个($R_{\text{int}}=0.0496$), $I>2(I)$ 的可观测数据是 5 092 个并用于结构修正,晶体结构用 SAINT (Bruker 2007) 和 SHELXL (Sheldrick 2008) 软件包进行结构解析和数据精修,采用 SADBAS 对所有经验吸收系数进行校正。采用直接法,并经数轮差值 Fourier 合成,找到全部非氢原子。O 上的氢原子是经差值 Fourier 合成得到,所有非氢原子的坐标及其各向异性温度因子用全矩阵最小二乘法进行精修,最终残差因子 $R_1=0.072\ 7$ 。配合物 3 的结构示意图如图 1 所示,其晶体结构数据和键长

键角数据分别如表 1 和表 2 所示。

配合物 3 的结构由 $[\text{Co}(\text{Hgly})_2(2,2'\text{-bpy})]$ 及 $[\text{Co}(\text{Hgly})_2(2,2'\text{-bpy})]$ 组成,每个钴离子分别与 2,2'-联吡啶分子上的 2 个氮原子和 2 个乙醇酸分子上的羟基和羧基氧原子形成配位键,从而构成扭曲的八面体结构。其中 N(1),O(2),O(5),O(6)与 $\text{Co}^{2+}(1)$ 及 N(4),O(9),O(11),O(12)与 $\text{Co}^{2+}(2)$ 分别位于各自八面体的赤道平面上,而 N(2)和 O(3)及 N(3)和 O(8)分别位于这 2 个八面体结构中的 4 个轴向的位置上,其 N(2)- $\text{Co}^{2+}(1)$ -O(3) 与 N(3)- $\text{Co}^{2+}(2)$ -O(8) 的二面角分别为 $170.21(16)^\circ$ 和 $164.40(17)^\circ$ 。该配合物中,Co-O 和 Co-N 的键长分别在 0.202 7 (4)~0.210 4 (4)nm 和 0.209 7(4)~0.210 7(4) nm 范围内。同时,该配合物的结构特征与配合物 $[\text{Zn}_2(\text{Hlact})_4(\text{phen})_2]^{14}$ 和配合物 $[\text{Cu}_2(\text{Hlact})_4(2,2'\text{-bpy})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}^{15}$ 的特征基本相似。

2.2 配合物 1~3 与牛血清白蛋白相互作用的荧光表征

固定牛血清白蛋白的浓度为 $10.0\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不变,通过不断改变配合物 1~3 的浓度,并以 $\lambda =$

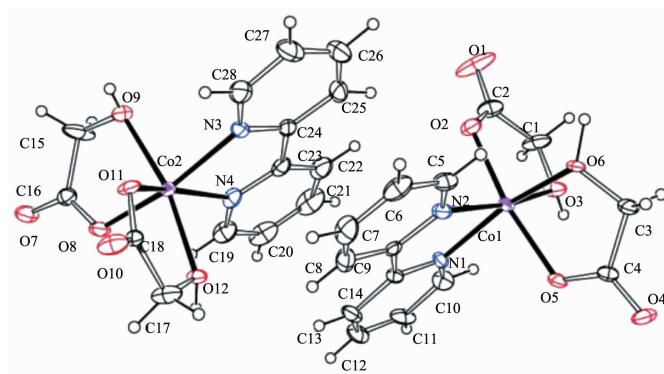


图 1 配合物(3)的晶体结构图(椭球几率为 30%)

Fig.1 Perspective view of the molecular structure for complex 3 with 30% probability ellipsoid

Table 1 Crystal data and structural refinements for complex 3

Empirical formula	$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6\text{Co}$	Space group	$P2_1/c$
Formula weight	365.2	Formula units / unit cell	8
Temperature / $^\circ\text{C}$	23	$D_c / (\text{g} \cdot \text{cm}^{-3})$	1.661
Crystal color	Brown	$F(000)$	1 496
Crystal system	Monoclinic	Diffractometer / radiation	Bruker Apex CCD / Mo $K\alpha$ ($\lambda=0.071\ 07\ \text{nm}$)
Cell constants:		Reflections collected / unique	13 899 / 5 092
a / nm	1.003 7(3)	R_{int}	0.049 6
b / nm	2.022 6(5)	Data / restraints / parameters	5 092 / 0 / 415
c / nm	1.660 1(4)	θ range / $^\circ$	1.74 to 28.37
$\beta / ^\circ$	119.942(13)	$R_1, wR_2 [I>2\sigma(I)]$	0.072 7, 0.146 7
V / nm^3	2.920 3(13)		

Table 2 Selected Bond Distances (nm) and Selected Bond Angles (°) for complex 3

Co(1)-O(2)	0.203 4(4)	Co(2)-O(8)	0.203 3(4)	Co(1)-O(3)	0.209 7(4)
Co(2)-O(9)	0.210 8(4)	Co(1)-O(5)	0.205 0(4)	Co(2)-O(11)	0.202 7(4)
Co(1)-O(6)	0.210 4(4)	Co(2)-O(12)	0.210 4(3)	Co(1)-N(1)	0.209 7(4)
Co(2)-N(3)	0.210 7(4)	Co(1)-N(2)	0.210 4(7)	Co(2)-N(4)	0.210 0(4)
O(2)-Co(1)-O(3)	77.63(14)	O(3)-Co(1)-N(2)	170.21(16)	O(2)-Co(1)-O(5)	169.13(16)
O(5)-Co(1)-O(6)	77.72(13)	O(2)-Co(1)-O(6)	98.32(15)	O(5)-Co(1)-N(1)	89.43(15)
O(2)-Co(1)-N(1)	96.43(16)	O(5)-Co(1)-N(2)	96.84(15)	O(2)-Co(1)-N(2)	93.4(2)
O(6)-Co(1)-N(1)	162.18(15)	O(3)-Co(1)-O(5)	92.39(15)	O(6)-Co(1)-N(2)	92.00(16)
O(3)-Co(1)-O(6)	93.13(15)	N(1)-Co(1)-N(2)	77.15(17)	O(3)-Co(1)-N(1)	99.78(16)
O(8)-Co(2)-O(9)	78.32(15)	O(9)-Co(2)-N(4)	97.58(16)	O(8)-Co(2)-O(11)	100.44(17)
O(11)-Co(2)-O(12)	78.48(13)	O(8)-Co(2)-O(12)	90.48(14)	O(11)-Co(2)-N(3)	90.34(17)
O(8)-Co(2)-N(3)	164.40(17)	O(11)-Co(2)-N(4)	158.67(17)	O(8)-Co(2)-N(4)	96.17(19)
O(12)-Co(2)-N(3)	102.80(15)	O(9)-Co(2)-O(11)	98.81(14)	O(12)-Co(2)-N(4)	88.15(15)
O(9)-Co(2)-O(12)	167.88(15)	N(3)-Co(2)-N(4)	76.38(18)	O(9)-Co(2)-N(3)	88.97(15)

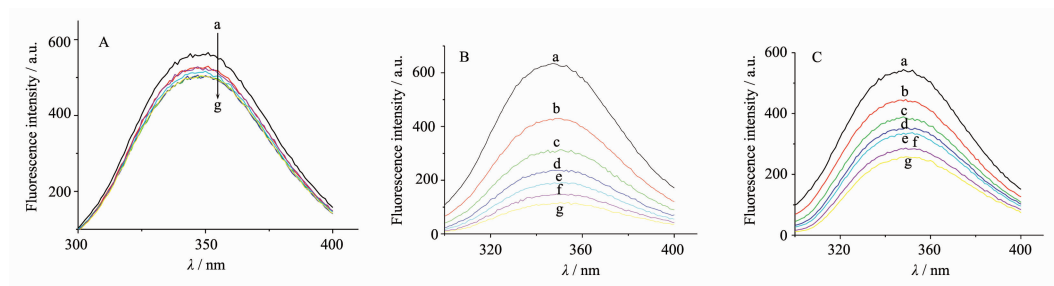
280 nm 的激发波长分别激发 BSA 溶液及 BSA 与配合物的混合溶液,然后分别记录波长为 300~400 nm 的荧光发射光谱,其荧光发射光谱的测定结果如图 2 所示。

当激发波长为 280 nm 时,配合物 **1~3** 在 300~400 nm 范围内无荧光发射,而 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^[6]。因此,固定 BSA 的浓度不变,分别依次加入不同浓度的配合物 **1~3**;随着配合物浓度的逐渐增加,配合物 **2** 和 **3** 对 BSA 在 $\lambda=350$ nm 附近的荧光发射峰强度有明显的淬灭作用,而配合物 **1** 对 BSA 的荧光没有明显的淬灭效果,其结果如图 2 所示。该实验结果初步表明配合物 **2** 和配合物 **3** 与 BSA 发生了一定程度的相互作用,而配合物 **1** 无法与 BSA 发生相互作用。比较 3 种钴配合物的结构特点,同时结合已报道的相关文献^[9-11,17-22],初步表明:对于某些配合物,其过渡

金属离子虽然具有配位不饱和的特征,而且蛋白质表面也具有可与过渡金属离子配位的羟基、氨基或羧基等基团,但该配合物仍然有可能无法与蛋白质相互作用,即配合物中过渡金属离子是否具有配位不饱和的特征,并不是衡量其能否与蛋白质相互作用的主要因素;或金属配合物上的配体与过渡金属离子形成的配合物的空间构型,可能会影响到该配合物是否能够与蛋白质相互作用。但如果该配合物中含有较强的疏水配体,如邻菲咯啉或 2,2'-联吡啶时,其都能与蛋白质发生相互作用,主要原因可能是因为蛋白质中具有疏水空腔,从而能够与配合物中疏水的配体采用范德华力形式进行相互作用。

2.3 配合物 **2** 和 **3** 对牛血清白蛋白的荧光猝灭方式的分析

根据 Stern-Volmer 方程^[23-24]: $F_0/F=1+k_q\tau_0C_Q=1+k_{sv}C_Q$; 分别取 BSA 与配合物 **2** 和 **3** 的混合体系在不



A: **1**; B: **2**; C: **3**. from a to g, $c/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0, 100.0, 120.0, respectively

图 2 不同浓度的配合物**1~3**对 BSA 溶液荧光光谱测定的影响

Fig.2 Effect for fluorescence spectra of BSA by different concentration of complexes **1~3**

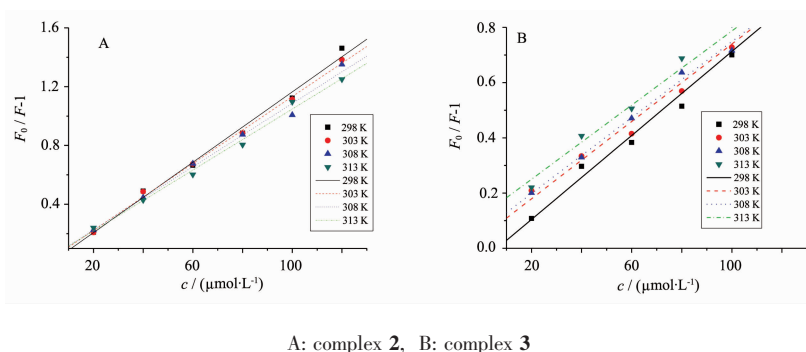


图 3 BSA 与配合物在不同温度时的 Stern-Volmer 曲线

Fig.3 Stern-Volmer curves of complexes and BSA at different temperatures

表 3 配合物与 BSA 在不同温度的 Stern-Volmer 常数和作用位点数
Table 3 k_{sv} and n of complexes and BSA at different temperatures

Complex	T / K	$k_{sv} (L \cdot mol^{-1})$	$k_q / (L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1})$	$K / (L \cdot mol^{-1})$	n
2	298	1.20×10^4	1.20×10^{12}	1.24×10^4	1.01
	303	1.14×10^4	1.14×10^{12}	8.1×10^3	0.97
	308	1.07×10^4	1.07×10^{12}	6.8×10^3	0.95
	313	1.03×10^4	1.04×10^{12}	5.0×10^3	0.92
3	298	7.6×10^3	7.6×10^{11}	9.3×10^3	1.03
	303	7.0×10^3	7.0×10^{11}	3.7×10^3	0.93
	308	6.8×10^3	6.8×10^{11}	1.6×10^3	0.83
	313	6.7×10^3	6.7×10^{11}	1.4×10^3	0.78

同温度时荧光发射光谱 350 nm 处的相对荧光强度为 F , 以 $(F_0/F-1)$ 对所加入的相应配合物 **2** 和 **3** 的浓度 c_Q 作图, 得到牛血清白蛋白的 Stern-Volmer 猝灭曲线, 其结果如图 3 所示; 由 Stern-Volmer 方程求得猝灭速率常数如表 3 所示。

由图 3 可以看出, 在不同温度时, 配合物 **2**-BSA 体系和配合物 **3**-BSA 体系的 Stern-Volmer 曲线基本上都具有较好的线性关系; 而且, 随着温度的升高, Stern-Volmer 常数逐渐减小, 该现象初步表明配合物 **2** 和 **3** 对牛血清白蛋白相的荧光猝灭方式都为静态猝灭; 另外由于各类猝灭剂对生物大分子的最大动态猝灭常数为 $2.00 \times 10^{10} L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ [25], 而配合物 **2** 和 **3** 对 BSA 的荧光猝灭常数 K_q 的平均值分别为 $1.11 \times 10^{12} L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ 和 $7.0 \times 10^{11} L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$, 远大于双分子间最大动态猝灭常数, 该结果也进一步说明该配合物 **2** 和 **3** 都是通过与牛血清白蛋白形成不发荧光的复合物进行相互作用的。

2.4 用静态猝灭法分析配合物与 BSA 的相互作用

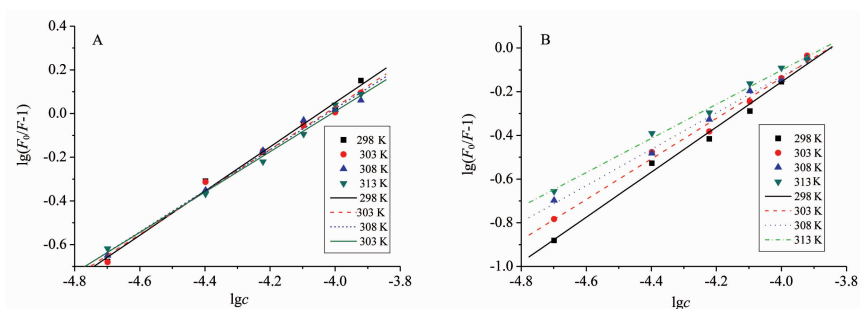
在静态猝灭过程中, 荧光物质与猝灭剂分子间的结合常数可根据荧光强度与猝灭剂浓度的关系求

出。设蛋白质大分子有 n 个相同并且相互独立的结合位置, 则有:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K + n \lg c_Q$$

其中 F_0 为未加入猝灭剂时的荧光强度; F 为加入猝灭剂后的荧光强度; K 为荧光体-猝灭剂的结合常数, c_Q 为配合物的浓度 [23-24]。将不同温度时, BSA 与配合物 **2** 和 **3** 的混合体系的荧光发射光谱曲线的 350 nm 处的 F_0 及 F 代入上式, 得到 $\lg(F_0/F-1)$ 与 $\lg c_Q$ 的关系图(图 4)。由图 4 分别求出在不同温度下的配合物 **2** 和 **3** 与 BSA 的结合常数 K 以及结合位点数 n (表 3)。

关于含有单一杂环化合物配体的配合物与 BSA 相互作用的文献已有一些报道 [19-21], 但通过测定对含有邻菲咯啉及 2,2'-联吡啶配体的配合物与 BSA 相互作用, 从而探讨含有这两种配体的配合物与 BSA 相互作用时, 其作用结果是否相同, 尚未有报道。而本文通过对配合物 **2** 和 **3** 与 BSA 相互作用的研究结果表明: 当配合物中分别含有邻菲咯啉及 2,2'-联吡啶配体时, 该配合物都能与 BSA 相互作



A: complex 2, B: complex 3

图 4 不同温度时配合物与 BSA 的 $\lg(F_0/F-1)-\lg c_Q$ 的关系曲线

Fig.4 Double-logarithm plot for the quenching of BSA by complex at four different temperatures

用,但它们与 BSA 相互作用并形成复合物后,该复合物的稳定性有所不同(表 3)。但相对于含有 2,2'-联吡啶配体的配合物而言,当温度升高时,其对含有邻菲咯啉配体的配合物与 BSA 所形成的复合物的稳定性的影响明显较小,其原因可能是因为邻菲咯啉配体比 2,2'-联吡啶配体具有更强的疏水性,从而导致其与 BSA 相互作用时,具有更强的范德华力的结果。

2.5 配合物与 BSA 间的作用力类型的分析

有机小分子和蛋白质等生物大分子之间主要是通过分子间的氢键、范德华力、静电引力等分子间作用力进行相互作用,这些分子间的作用力在发生相互作用时,反应前后的体系的热力学参数会发生一定程度的变化。因此,可以通过测定体系的热力学参数的变化来判断小分子与蛋白质分子链之间的主要作用力的类型^[20]。表 4 的 ΔH 、 ΔS 以及 ΔG 的计算值

是分别通过以下 3 个方程计算所得(其中 ΔH 看成常数)

$$\ln K = -\frac{\Delta_r H_m^\ominus}{RT} + C$$

$$\Delta G = -RT \ln K$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Ross^[27]与 Mohammed^[28]等根据大量的实验结果总结出判断生物大分子与小分子结合力性质的热力学规律,即: $\Delta S > 0$ 可能是疏水和静电作用力; $\Delta S < 0$ 可能为氢键和范德华力; $\Delta H > 0, \Delta S > 0$ 为典型的疏水作用力; $\Delta H \approx 0$ 或较小, $\Delta S > 0$ 为静电作用力; $\Delta H < 0, \Delta S < 0$ 为氢键和范德华力。

从表 4 数据中可以看出:配合物 2 和 3 与 BSA 相互作用时,体系的 ΔH 和 ΔS 均小于零,该结果初步说明这两个配合物与 BSA 间相互作用时的主要作用力是氢键和范德华力。

表 4 配合物 2 和 3 与 BSA 相互作用的热力学参数的计算

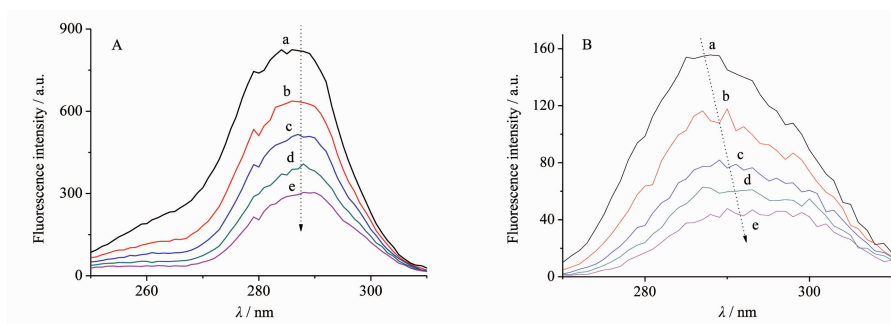
Table 4 Thermodynamic parameters of BSA with complexes 2 and 3

complex	$\Delta H / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S / (\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta G / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
2	43.2	-67.1	-42.6
3	96.3	-249	-94.2

2.6 配合物与 BSA 的相互作用的同步荧光光谱分析

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。而蛋白质的荧光主要来自色氨酸、酪氨酸, 所以一般通过对色氨酸或酪氨酸的同步荧光的测定, 可以探讨色氨酸或酪氨酸的构象或周围环境是否发生改变^[29]。图 5 和图 6 分别为 298 K, $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ 与 $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$ 时, 配合物 2 和 3 与 BSA 相互作用时的同步荧光的测定结果。

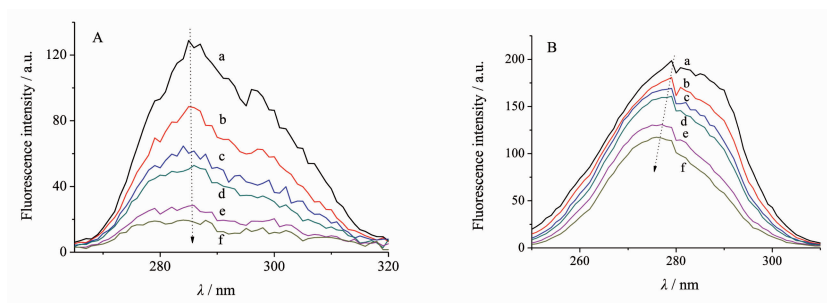
如图 5 和图 6 所示, 分别保持 BSA 的浓度为 $10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不变, 逐渐增加配合物 2 和 3 的浓度, 体系在 290 nm 附近的同步荧光光谱强度均逐渐降低。同时 BSA 在 $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ 的同步荧光光谱中, 其荧光最大发射波长都没有明显的变化; 但在 $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$ 的同步荧光光谱中, 其荧光最大发射波长的变化却有所不同, 即: 配合物 2 使 BSA 的荧光最大发射波长发生一定程度的红移, 而配合物 3 使 BSA 的荧光最大发射波长发生一定程度的蓝移。该实验结果



A: $\Delta\lambda=15$ nm; B: $\Delta\lambda=60$ nm; from a to e, $c_2 / (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: 0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0, respectively

图 5 配合物 2 与 BSA 相互作用时的同步荧光光谱

Fig.5 SFS of complex 2 and BSA



A: $\Delta\lambda=15$ nm; B: $\Delta\lambda=60$ nm; from a to f, $c_3 / (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: 0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0, 100.0, respectively

图 6 配合物 3 与 BSA 相互作用时的同步荧光光谱

Fig.6 SFS of complex 3 and BSA

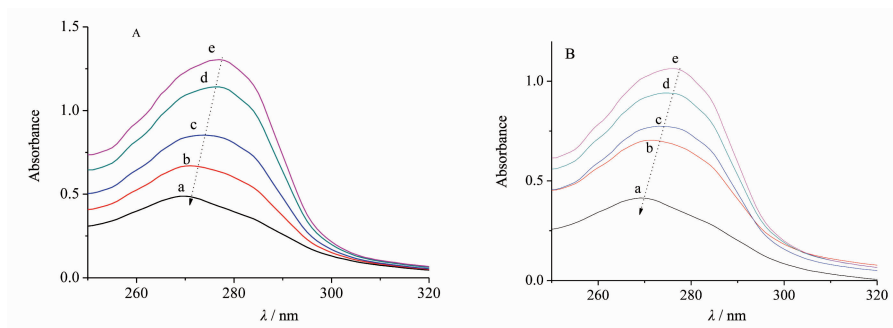
初步表明:当分别含有邻菲咯啉和 2,2'-联吡啶配体的配合物与 BSA 相混合时,它们都能与 BSA 相互作用,且主要的作用力都是氢键和范德华力,但它们对蛋白质中色氨酸的构象或其周围环境的影响却是不同的。

2.8 配合物 2 和 3 与牛血清白蛋白相互作用的紫外表征

保持配合物 2 和 3 的浓度不变,分别加入不同

浓度的 BSA 溶液,同时以相同浓度的配合物溶液为参比,分别测定波长为 200~400 nm 的紫外吸收光谱,其结果如图 7 所示。

保持配合物 2 和 3 的浓度不变,当 BSA 的浓度逐渐增加时,其紫外吸收光谱如图 7 所示,它们在 270 nm 附近的吸光度也逐渐增加,同时其最大吸收波长也都逐渐发生红移,该结果在一定程度上是由于配合物 2 和 3 与 BSA 分别形成新的复合物的结果^[30-31]。



A: complex 2, B: complex 3; from a to e, $c / (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: 0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, respectively

图 7 不同浓度的 BSA 与配合物 2 和 3 相互作用时的紫外吸收光谱

Fig.7 Absorption of complexes 2 and 3 in presence of BSA at different concentrations

3 结 论

本文利用溶液法合成了3种钴乙醇酸配合物,并利用X-射线单晶衍射对配合物**3**进行了表征;同时也测定了配合物**1~3**与BSA相互作用的结果,结果表明:配合物**1**无法使BSA的荧光发生猝灭,而配合物**2**和配合物**3**对BSA的荧光猝灭为静态猝灭过程;比较3种钴配合物的结构特征,表明具有配位不饱和的配合物并不是衡量该配合物能否与蛋白质相互作用的主要因素,但由于蛋白质中具有疏水的空腔,因此,如果该配合物中含有较强的疏水配体,如邻菲咯啉或2,2'-联吡啶时,其都能与蛋白质发生相互作用。而当分别含有邻菲咯啉和2,2'-联吡啶配体的配合物与BSA相互作用时,其作用力都主要是基于氢键和范德华力,但它们对蛋白质中色氨酸的构象或其周围环境的影响却是不同的。

参考文献:

- [1] Schneider H J. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2009**, **48**:3924-3977
- [2] Yu Y, Liu X G, Lu Y, et al. *Chem. Res. Chin. Univ.*, **2011**, **27**(6):1000-1005
- [3] Choi B M, Kim Y M, Jeong Y R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2004**, **321**:132-137
- [4] Wang X F, Du Z W, Wu M, et al. *Chem. Res. Chin. Univ.*, **2012**, **28**(4):662-665
- [5] Baroni S, Mattu M, Vannini A, et al. *Eur. J. Biochem.*, **2001**, **268**:6214-6220
- [6] Ulrich K-H. *Pharmacol. Rev.*, **1981**, **33**(1):17-23
- [7] Venugopal R, Mallayan P, Vaiyapuri S P, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, **116**:151-162
- [8] Atanu S R, Debi R T, Arup K G, et al. *J. Lumin.*, **2012**, **132**:2943-2951
- [9] LIN Hai-Bin(林海彬), WANG Qing-Xiang(汪庆祥), ZHOU Zhao-Hui(周朝晖). *Chinese J. Inorg. Chem.* (无机化学学报), **2011**, **27**:1239-1244
- [10] LIN Hai-Bin(林海彬), ZHENG Lin(郑琳), LIN Yu-Qin(林玉琴), et al. *Chem. J. Chinese Universities* (高等学校化学学报), **2013**, **34**(8):1818-1825
- [11] LIN Hai-Bin(林海彬), ZHANG Mei-Xin(张美鑫), LIN Liang-Liang(林凉凉), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.* (无机化学学报), **2013**, **29**(11):2315-2322
- [12] Carballo R, Castiñeiras A, Covelo B, et al. *Acta Cryst.*, **2003**, E59:m588-m590
- [13] Lin H B, Wang Q X, Zhang C M, et al. *Chin. Chem. Lett.*, **2011**, **22**:969-972
- [14] Covelo B, Carballo R, Vázquez-Lpez E M. *CrystEngComm.*, **2006**, **8**:167-177
- [15] Carballo R, Castiñeiras A, Balboa S, et al. *Polyhedron*, **2002**, **21**:2811-2818
- [16] Brustein E A, Vedenkina N S, Irkova M N. *Photochem. Photobiol.*, **1973**, **18**:263-275
- [17] Guo Q, Li L Z, Dong J F, et al. *Spectrochim. Acta, Part A*, **2013**, **106**:155-162
- [18] Bhogale A, Patel N, Sarpotdar P, et al. *Colloids Surf., B*, **2013**, **102**:257-264
- [19] Zhang F, Lin Q Y, Hu W L, et al. *Spectrochim. Acta, Part A*, **2013**, **110**:100-107
- [20] Heather F C, Julianne P, Farhat N, et al. *Dalton Trans.*, **2012**, **41**:2720-2731
- [21] Jayabharathi J, Thanikachalam V, Sathishkumar R, et al. *J. Photochem. Photobiol., B*, **2012**, **117**:222227
- [22] Xue F, Xie C Z, Zhang Y W, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, **115**:78-86
- [23] YANG Pin(杨频), GAO Fei(高飞). *Principles of Bioinorganic Chemistry* (生物无机化学原理). Beijing: Science Press, **2002**:329-331
- [24] Mariam J, Dongre P M, Kothari D C. *J. Fluoresc.*, **2011**, **21**(6):2193-2199
- [25] YANG Man-Man(杨曼曼), XI Xiao-Li(席小莉), YANG Pin(杨频). *Chem. J. Chinese Universities* (高等学校化学学报), **2006**, **27**:687-691
- [26] SONG Yu-Min(宋玉民), WU Jin-Xiu(吴锦绣). *Chinese J. Inorg. Chem.* (无机化学学报), **2006**, **22**:2165-2172
- [27] Ross P D, Subramanian S. *Biochemistry*, **1981**, **20**(11):3096-3102
- [28] Mohammed H R, Toru M, Tomoko O, et al. *Biochem. Pharmacol.*, **1993**, **46**(10):1721-1731
- [29] Miller J N. *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.*, **1979**, **16**:203-208
- [30] XIE Meng-Xia(谢孟峡), XU Xiao-Yu(徐晓云), WANG Ying-Dian(王英典). *Acta Chim. Sinica* (化学学报), **2005**, **63**:2055-2062
- [31] WEI Yong-Ju(魏永巨), TONG Shen-Yang(童沈阳), LI Ke-An(李克安). *Acta Chim. Sinica* (化学学报), **1995**, **53**:83-89