

四磺基酞菁钴合成及其与牛血清白蛋白结合作用的研究

黄焱^{1,3}, 徐国兴^{2*}, 彭亦如^{4*}, 翁家宝^{4,5}

1. 山东大学医学院, 山东 济南 250012
2. 福建医科大学附属第一医院, 福建 福州 350005
3. 福建医科大学基础医学院, 福建 福州 350004
4. 福建师范大学化学与材料学院, 福建 福州 350007
5. 中国科学院福建物质结构研究所结构化学国家重点实验室, 福建 福州 350002

摘要 以高锰酸钾降解薛氏钠盐(6-羟基-萘磺酸钠)合成4-磺基邻苯二甲酸,并以此为原料“固相熔融法”合成了四磺基酞菁钴(CoPcS_4)。 CoPcS_4 在DMSO中发生解聚,随着pH值的升高,解聚增加。 CoPcS_4 以二聚体形式与牛血清白蛋白(BSA)结合后具有更强的光敏活性。分别采用紫外和荧光光谱分析方法准确测定了四磺基酞菁钴与BSA的结合位置数和结合常数。两种方法的结果基本一致,数量级皆为 $10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。 CoPcS_4 与BSA的首要结合位置为Site 和Site ,两种结合位置的结合能力差别不大。结果表明, CoPcS_4 可与牛血清白蛋白很好地结合,白蛋白起到存储与转运作用。

关键词 四磺基酞菁钴;牛血清白蛋白;竞争络合;结合常数

中图分类号: O644.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2008)02-0407-05

引言

磺基酞菁配合物具有良好的水溶性,作为一种有效的光敏剂可以在肿瘤组织中有选择性地富集,从而对恶性肿瘤起到荧光定位诊断和光动力治疗作用^[1]。此外磺基酞菁还可以用于治疗HIV^[2],各种原因引起的脉络膜新生血管^[3]等一系列非肿瘤性疾病。

白蛋白是血清中一种重要的蛋白,它对负电荷分子有较大的亲和力,能与许多内源及外源性化合物结合,起到存储与转运作用,因此研究磺基酞菁配合物与白蛋白的结合对阐明其在体内的运输、分布和代谢具有重要意义^[4]。

合成磺基取代酞菁金属配合物通常采用“一锅煮”的方法,即将无取代金属酞菁与发烟硫酸直接反应,产物为含不同数目磺基的酞菁金属配合物的混合物,同时还形成磺基位于3-位或4-位的异构体。由于反应条件不易控制,反应结果难以重现,给分离和纯化造成困难^[5]。Ali等^[6,7]曾以邻苯二甲酸4-磺基单钠盐为原料合成得到了四磺基氯化酞菁镓四钠盐,但其所用的4-磺基邻苯二甲酸单钠盐中还含有25%

3-磺基邻苯二甲酸单钠盐。

针对上述合成方法存在的问题,本文以高锰酸钾降解薛氏钠盐(6-羟基-萘磺酸钠)合成4-磺基邻苯二甲酸,并以此为原料“固相熔融法”合成了四磺基酞菁钴。此合成方法具有原料易得,所得配合物组成确定,异构体少和结构明确等优点。

分别用荧光猝灭法和紫外光谱法测定了四磺基酞菁钴与牛血清白蛋白的结合常数和结合位置数,研究了它们之间的相互作用。

1 仪器及试剂

英国Perkin-Elmer PE-983 G红外光谱仪(KBr压片),美国瓦里安公司Cary 50紫外-可见吸收光谱仪,日本岛津公司RF 540荧光分光光度计;上海雷磁仪器厂PHS-3C精密pH计。四磺基酞菁钴(CoPcS_4)以4-磺基邻苯二甲酸为“分子碎片”,经固相熔融法合成,产物经IR, UV/Vis, TG表征;牛血清白蛋白(BSA)、氯血红素(HE)、L-色氨酸(TRP)皆为中国医药(集团)上海化学试剂公司产品,BSA分子量按67000

收稿日期: 2006-09-09, 修订日期: 2007-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(20604007),福建省自然科学基金项目(C0510007),教育部重点科技计划(206071),福建省教育厅重点项目(JA05195),结构化学国家重点实验室项目(040083),福建省重点项目(2002Y002)和福建省科技厅重点项目(200710013)资助

作者简介: 黄焱,女,1971年生,福建医科大学基础医学院副教授

*通讯联系人 e-mail: zjfmuxgx@pub5.fz.fj.cn; rueruepeng@163.com

计算;布洛芬 (IB) 为哈尔滨滨凯制药有限公司出品;其他试剂均为分析纯;CoPcS₄ 以水溶解配成 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液;BSA 配成 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液;氯血红素、布洛芬、L-色氨酸分别配成 2×10^{-3} , 1×10^{-3} , $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液;缓冲溶液以 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸和 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠按比例配置。

2 结果与讨论

2.1 CoPcS₄ 的紫外光谱

已有研究表明,四磺基酞菁的紫外光谱与溶液浓度、溶剂、pH 值等因素有很大关系,我们研究了这些因素对 CoPcS₄ 的紫外光谱的影响。

图 1 表明 CoPcS₄ 在不同溶液中的紫外光谱有着很大的差别,水溶液中 CoPcS₄ 在 625 nm 处存在 Q_d 吸收峰,一般认为 Q_d 带为磺基酞菁的二聚体特征吸收峰^[8],而表示单体的 $Q_{(0,0)}$ 峰在 666 nm 处。在强极性溶剂二甲亚砜(DMSO)中 CoPcS₄ 的 Q_d 吸收峰位蓝移到 608 nm 处,吸光度比水中小, $Q_{(0,0)}$ 峰位置红移到 671 nm,吸光度比在水中大,可以认为在 DMSO 出现了明显的解聚现象。

图 2 给出了溶液 pH 值对 CoPcS₄ 的紫外光谱的影响。CoPcS₄ 的 $Q_{(0,0)}$ 吸收峰的强度随着溶液 pH 值的增加而增强,表明随着溶液 pH 值的增加,CoPcS₄ 解聚程度增加。

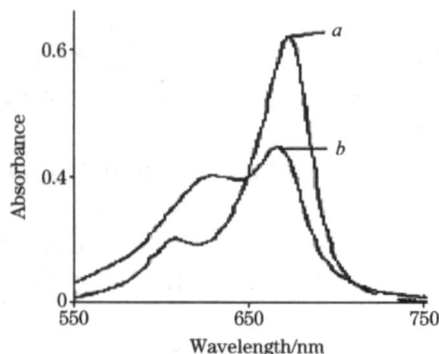


Fig 1 Absorption spectra of CoPcS₄

$c_{\text{CoPcS}_4} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

a: DMSO; b: water

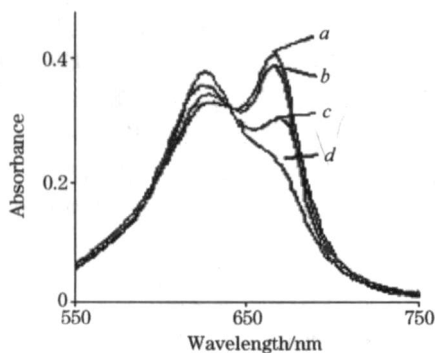


Fig 2 Effect of pH on UV spectra of CoPcS₄

$c_{\text{CoPcS}_4} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

a: pH 9; b: pH 7; c: pH 5; d: pH 3

2.2 CoPcS₄ 与 BSA 的结合作用

2.2.1 CoPcS₄ 与 BSA 体系的紫外光谱

图 3 为 CoPcS₄ 在 BSA 体系中的紫外光谱图,BSA 滴定 CoPcS₄, 625 nm 处的 Q_d 峰强度减弱,红移至 627 nm; 666 nm 处的 $Q_{(0,0)}$ 峰强度增强,红移至 675 nm,体系出现明显的解聚现象。说明 CoPcS₄ 以二聚体形式与 BSA 结合,与 BSA 结合后的 CoPcS₄ 具有更强的光敏活性。

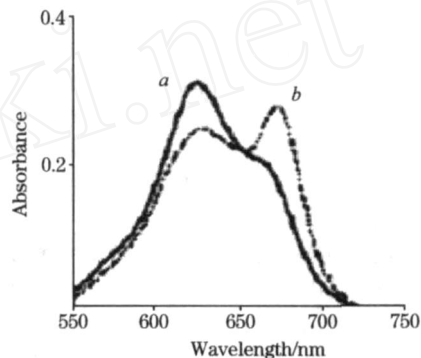


Fig 3 UV spectra of CoPcS₄-BSA system

25 pH 4; a: CoPcS₄; b: CoPcS₄ + BSA

$c_{\text{CoPcS}_4} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

我们利用 Scatchard 模型^[9],对酞菁药物与 BSA 的反应体系进行了分析。该方程为:

$$R/[D]_f = K_A(n - R) \quad (1)$$

其中 $R = [D]_B/[P]$,称为平均结合数,即与 1 摩尔蛋白相结合的药物的量, $[P]$ 为蛋白浓度, $[D]_B$ 为结合酞菁药物浓度, $[D]_f$ 为游离酞菁药物浓度, K_A 为结合常数, n 为结合位数。以 R 对 $R/[D]_f$ 作图,由直线斜率和截距可算出 K 和 n ^[10]。测量酞菁药物空白的吸光度 A_0 和结合反应体系的吸光度 A ,计算出 $[D]_f$ 和 R 。CoPcS₄-BSA 体系的相互作用参数见表 1。

Table 1 Parameters of CoPcS₄ binding with BSA (pH 4)

	Scatchard 模型	荧光猝灭法
结合常数 $K_A / \times 10^5$	3.24	4.55
结合位置数 n	1.9	-
线性相关系数 r	0.995	0.997

2.2.2 CoPcS₄ 与 BSA 体系的荧光光谱

BSA 上色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的存在,使其具有内源荧光^[11]。CoPcS₄ ($0 \sim 1.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 滴定 BSA ($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),随着 CoPcS₄ 浓度的增大,BSA 荧光强度有规律地降低,但发射峰位及峰形不变(如图 4)。可以认为白蛋白带有较多游离氨基,在酸性介质中(pH 4)由于质子化而呈正电荷状态,与溶液中带负电荷的 CoPcS₄ 相互作用,导致荧光物质 BSA 荧光强度降低。引起 BSA 荧光猝灭的原因可能有动态猝灭和静态猝灭^[12],猝灭原因可以通过计算结合常数来判断为静态猝灭即结合形成了没有荧光的化合物,计算过程见下文。图 5 表示的是在 CoPcS₄-BSA 体系随 pH 值变化的荧光光谱,pH 4 的时候,荧光猝灭幅度最大。

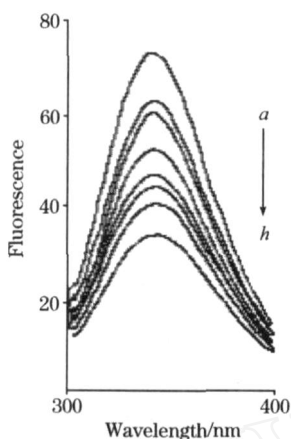


Fig 4 Fluorescence quench spectra of CoPcS₄

25 pH 4, $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$
 $c_{BSA} : 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{CoPcS_4} : 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 a: 0; b: 0.2; c: 0.4; d: 0.6;
 e: 0.8; f: 1.0; g: 1.2; h: 1.4

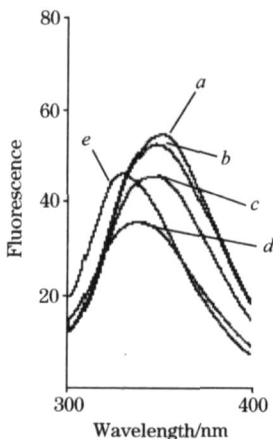


Fig 5 Effect of pH on spectra of CoPcS₄-BSA system

25, $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$
 $c_{BSA} : 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{CoPcS_4} : 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 pH: a: 7; b: 6; c: 5; d: 4; e: 3

对于 BSA 这样有多个彼此相同又互相独立的键合位置的生物大分子^[13], 有

$$F_0 / F = 1 + K_A [Q] \quad (2)$$

F_0 为未加 CoPcS₄ 时 BSA 的荧光强度, F 表示加入浓度为 $[Q]$ 的 CoPcS₄ 后 BSA 的荧光强度, K_A 为结合常数。可由 (2) 式可推得

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + F_0^{-1} K_D [Q]^{-1} \quad (3)$$

由以 CoPcS₄ 的 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 $[Q]^{-1}$ 作双倒数图, 得图 6, 由斜率和 F_0^{-1} 求得 CoPcS₄ 与 BSA 的解离常数 K_D , 由 K_D 换算出结合常数 K_A (表 1)^[14]。因为 $K_A = K_q \tau_0$, τ_0 为 BSA 的荧光寿命约为 10^{-8} s , 求得 CoPcS₄ 的表观猝灭常数 K_q 数量级都在 10^{13} 以上^[15], 远大于猝灭剂对生物大分子的最大扩散猝灭常数, 说明静态猝灭是引起 CoPcS₄-BSA 荧光猝灭的主要原因, 进一步说明 CoPcS₄-BSA 结合形成了没有荧光的化合物, 导致 BSA 的荧光强度降低。

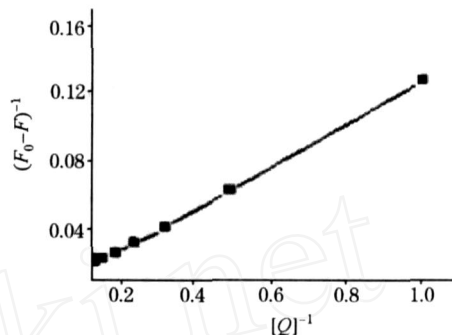


Fig 6 Lineaver-burk curve of CoPcS₄ fluorescence quenching

2.2.3 HE, IB, TRP 与 CoPcS₄ 竞争络合

血清白蛋白的三维晶体结构已探明, 有 3 个类似的结构域: Site 1, Site 2 和 Site 3^[16]。每个结构域又含有 A 与 B 2 个亚结构域。6 个区域以槽口相对的方式形成圆筒状结构, 分子探针对蛋白质不同区域有特异性的结合^[17]。Site 1 的探针有华法令、保泰松、氯血红素等; Site 2 探针有布洛芬、氯灭酸等; Site 3 有 L-色氨酸。为了探明 CoPcS₄ 与 BSA 的结合位置, 以氯血红素 (HE)、布洛芬 (IB)、L-色氨酸 (TRP) 分别作为白蛋白特定结合位置的标记药物, 研究了它们对 CoPcS₄-BSA 体系紫外和荧光光谱的影响, 以确定 CoPcS₄ 在 BSA 上的结合位置。为了使分子探针充分与体系结合, 三种标记药物与 CoPcS₄ 浓度比分别为: CoPcS₄/HE 为 1/20, CoPcS₄/IB 为 1/20, CoPcS₄/TRP 为 1/1000^[18-20]。

由于 CoPcS₄ 在缓冲溶液体系中是以二聚体和单体两种形式共存, 而在 CoPcS₄-BSA 体系中, 由于与 BSA 的相互作用, CoPcS₄ 出现了解聚现象。往相同浓度的 CoPcS₄-BSA (皆为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 体系分别滴加 HE ($2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), IB ($2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), TRP ($1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 加入 HE 和 IB 后又都重新出现了二聚体的峰增强, 单体峰减弱的聚合现象。说明 CoPcS₄ 被置换, 呈现游离态; 而加入

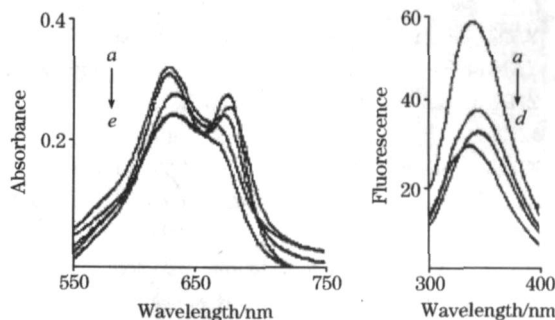


Fig 7 (A) Effect of molecule probe on UV spectra of CoPcS₄-BSA (1 : 1) system; (B) Effect of molecule probe on fluorescence spectra of CoPcS₄-BSA (1 : 1) system

a: CoPcS₄; b: CoPcS₄ + BSA + HE; c: CoPcS₄ + BSA + IB;
 d: CoPcS₄ + BSA; e: CoPcS₄ + BSA + TRP
 $c_B : 2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{TRP} : 1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

TRP后并没有观察到光谱变化(图 7a)。在其荧光光谱(图 7b)中, HE和 IB会使被 CoPcS₄ 猝灭的 BSA 的荧光重新增强。以上结果表明, CoPcS₄ 与 BSA 的主要结合位置为 Site 和 Site 。为了进一步确定 CoPcS₄ 与 BSA 主要结合点,使 CoPcS₄ 与 BSA 的浓度分别为 1×10^{-5} 和 1×10^{-4} mol · L⁻¹ (10^{-10}), 此时 CoPcS₄ 与 BSA 几乎全部在主要的结合点上与 BSA 结合, 用 HE 与 IB 滴定 CoPcS₄-BSA 的体系, 都出现了 CoPcS₄ Q 带单体吸收峰增强, 二聚体吸收峰减弱的现象(见图 8), 说明 CoPcS₄ 在 BSA 上的 Site 和 Site 两种结合位置的结合能力差别并不大。

上述研究结果表明, CoPcS₄ 可与牛血清白蛋白很好地结合, 白蛋白起到存储与转运作用。

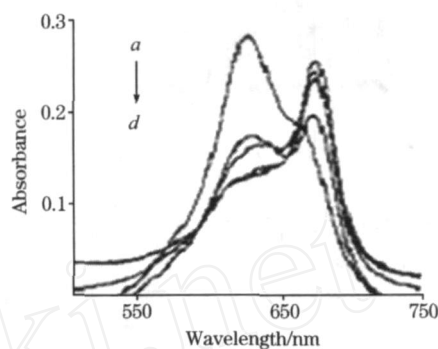


Fig 8 Effect of molecule probe on UV spectra of CoPcS₄-BSA system

a: CoPcS₄; b: CoPcS₄ + BSA + HE;
c: CoPcS₄ + BSA + IB; d: CoPcS₄ + BSA
CoPcS₄: 1×10^{-5} mol · L⁻¹; cBSA: 1×10^{-4} mol · L⁻¹
cHE: 2×10^{-4} mol · L⁻¹; cIB: 2×10^{-2} mol · L⁻¹

参 考 文 献

- [1] Yang Y C, Ward J R, Seiders R P. Inorganic Chemistry, 1985, 24(12): 1765.
- [2] Anderi N Vzorov. Antiviral Research, 2003, 59: 99.
- [3] Morgan A R, Carbo G M, Keck R W. J. Photochem. Photobiol. B, 1990, 6: 133.
- [4] YU Tian-zhi, YANG Ru-dong(俞天智, 杨汝栋). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(4): 763.
- [5] Spike J D. Photochem. Photobiol., 1986, 43(6): 691.
- [6] Ali H, Langlois R, Wagner J R, et al. Photochem. Photobiol., 1988, 47(5): 713.
- [7] PENG Yr-ru, CHEN Nai-sheng, HUANG Jin-ling(彭亦如, 陈耐生, 黄金陵). China Journal of Applied Chemistry(应用化学), 2002, 19(8): 730.
- [8] L ÜLin, WU Xing, YUAN Shi-hai(吕琳, 吴星, 袁诗海). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1999, 19(5): 751.
- [9] Jones M N. Chem. Soc. Rev., 1992, 21: 127.
- [10] ZHANG Hong-yi, LIU Bao-sheng, WANG Pu-li(张红医, 刘保生, 王甫丽). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(2): 342.
- [11] Eftink M R, Ghiron C A. Analytical Biochemistry, 1981, 114: 199.
- [12] ZHANG Xiao-wei, ZHAO Feng-lin, LI Ke-an(张晓威, 赵凤林, 李克安). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 1999, 20(7): 1063.
- [13] YANG Pin, YANG Man-man, YANG Bin-sheng(杨频, 杨曼曼, 杨斌盛). Chinese Science Bulletin(科学通报), 1993, 38(22): 2051.
- [14] YANG Man-man, YANG Pin, ZHANG Li-wei(杨曼曼, 杨频, 张立伟). Chinese Science Bulletin(科学通报), 1994, 39(1): 31.
- [15] ZHANG Bao-lin, WANG Wen-qing, YUAN Rong-rao(张保林, 王文清, 袁荣尧). Acta Chemica Sinica(化学学报), 1994, 52(12): 1213.
- [16] Kragh-Hannsen U. Pharmacol. Rev., 1981, 33(1): 17.
- [17] XU Yan, SHEN Han-xi, HUANG Han-guo(徐岩, 沈含熙, 黄汉国). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 1996, 17(12): 1855.
- [18] Filyasova A I, Kudelina I A. Journal of Molecular Structure, 2001, 565: 173.
- [19] Dolmans D E, Fukumura D, Jain R K. Nature Reviews Cancer, 2003, 3(5): 380.
- [20] Sharma W M, Van Lier J E. Bioconjugate Chem., 2005, 16(5): 1166.

Study on the Interaction of Tetra-Sulfonated Phthalocyanine Cobalt with Bovine Serum Albumin

HUANG Yan^{1,3}, XU Guo-xing^{2*}, PENG Yi-ru^{4*}, WENG Jia-bao^{4,5}

1. Medical College of Shandong University, Ji 'nan 250012, China

2. The Affiliated First Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China

3. College of Preclinical Medicine of Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

4. College of Chemistry & Materials, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

5. State Key Laboratory for Structure Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Fuzhou 350002, China

Abstract The tetra-sulfonated phthalocyanine cobalt (CoPcS₄) was synthesized by using 4-sulfonic phthalic acid as raw material, CoCl₂ as template agent and (NH₄)₂MoO₄ as catalyst. CoPcS₄ was demonstrated to be C₄h mono-isomer by elementary analysis, IR, NMR and HPLC. Depolymerization of CoPcS₄ was found in DMSO. The depolymerization increased with the pH value raising. The interaction of tetra-sulfonated phthalocyanine cobalt with bovine serum albumin (BSA) was studied by UV-Vis and fluorescence spectra. The number of binding sites and binding constant were determined at equal pace of the order of magnitude 10⁵ L · mol⁻¹. CoPcS₄ binds with BSA at Site and Site . In conclusion, CoPcS₄ binds with BSA commendably and albumin plays a role of storage and transport.

Keywords Tetra-sulfonated cobalt phthalocyanine; Bovine serum albumin; Competitive-binding; Parameters of binding

(Received Sep. 9, 2006; accepted Jan. 16, 2007)

* Corresponding author