

血红蛋白与铜(Ⅱ)-茜素红S络合物相互作用的研究

吴小华, 缪吉根, 缪煜清, 陈建荣

浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004

摘要 采用 UV-Vis 光谱法, 研究在 pH 4.2 的 $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液中血红蛋白(Hb)与铜(Ⅱ)-茜素红 S(ARS)络合物的反应。结果表明: Hb 与 Cu(Ⅱ)-ARS 络合物相互作用形成红色的离子缔合复合物, 该复合物的最大吸收波长为 537 nm。在此波长下测得复合物的组成为 $n_{\text{Hb}} : n_{\text{Cu(Ⅱ)}} : n_{\text{ARS}} = 1 : 4 : 8$, 表观摩尔吸光系数为 $1.52 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, Hb 浓度在 $1.0 \times 10^{-7} \sim 2.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内与吸光度呈线性关系, 回归方程为 $A = 0.0269 + 151.675c (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$, 相关系数 $r = 0.9972$ 。考察了溶液酸度、试剂用量、反应时间与温度、离子强度、表面活性剂等因素对 Hb-Cu(Ⅱ)-ARS 复合物形成的影响, 并对反应机理做了初步探讨, 发现 Hb 与 Cu(Ⅱ)-ARS 络合物之间主要以静电引力相结合。进一步考察了常见氨基酸及金属离子对 Hb-Cu(Ⅱ)-ARS 复合物形成的影响。

关键词 血红蛋白; 铜(Ⅱ)-茜素红 S 络合物; UV-Vis 光谱法

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2007)06-1168-04

引言

蛋白质是生命机体必不可少的生命基础物质, 因此蛋白质的定量在生物化学、临床医学及食品检验等领域具有重要意义^[1-3]。近年来有机小分子或金属络合物作为光谱探针与蛋白质相互作用的研究报道较多, 由于蛋白质种类繁多, 研究比较多的是一些常见的蛋白质如血清白蛋白^[4-9]。

血红蛋白(Hb)是脊椎动物红细胞内的呼吸蛋白, Hb 分子具有四级结构, 由两条 α 和两条 β 多肽链组成, 每条肽链与一个血红素结合, 血红素位于肽链折叠所形成的介电常数较低的疏水环境中, 铁离子以共价键形式与卟啉的 4 个吡咯环中的 N 原子以及肽链中的组氨酸相连接^[10]。对血红蛋白的研究主要集中在它的电化学性质及过氧化物酶特性方面^[11-15], 有关有机小分子作为光谱探针与血红蛋白相互作用的研究报道较少^[16-18], 金属络合物作为光谱探针与血红蛋白相互作用的研究未见报道。本文以铜(Ⅱ)-茜素红 S(ARS)络合物为光谱探针, 研究在 pH 4.2 的 $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液中, Hb 与 Cu(Ⅱ)-ARS 络合物的反应。结果表明: Hb 阳离子与 Cu(Ⅱ)-ARS 络合物阴离子主要通过静电引力和疏水作用力形成红色的离子缔合复合物, 该复合物的吸收峰位于波长 537 nm 处; 实验获得了复合物的组成、表观摩尔吸光系数、吸光度与 Hb 浓度之间的线性关系等有关数据及信

息, 并研究了离子强度、表面活性剂、常见氨基酸及金属离子对反应的影响, 这些研究对于 Hb 的定量测定具有一定意义, 同时也为其他金属络合物(如药物、重金属解毒剂等)与 Hb 等生物大分子的相互作用研究奠定了一定的基础。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

UV1900PC 紫外分光光度计(上海亚研电子科技有限公司); 722 型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); PB-10 型 pH 计(德国赛多利斯股份公司)。牛血红蛋白(生化试剂, 上海蓝季科技发展有限公司): 配成 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液, 于 4℃ 下冰箱保存, 用时逐级稀释至浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液; 茜素红 S: $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液; 铜(Ⅱ)离子标准溶液: 配成 $1.6 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液, 用时逐级稀释至 $1.1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度; 氯化钠: 0.2 mol·L⁻¹ 溶液; 十六烷基三甲基溴化铵(CTMAB)、十二烷基苯磺酸钠(SDBS): 1 mg·mL⁻¹ 溶液; 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100): 0.5% 溶液; pH 3.0~6.0 的磷酸盐缓冲溶液。实验所用其他试剂均为分析纯, 水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

在 10 mL 比色管中, 依次加入 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 茜素红 S 溶液 1.5 mL, $1.1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的铜(Ⅱ)标准溶液

收稿日期: 2006-12-09, 修订日期: 2007-04-24

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(Y404012)和中国科学院长春应用化学研究所电分析化学国家重点实验室开放课题资助

作者简介: 吴小华, 女, 1961 年生, 浙江师范大学化学与生命科学学院副教授 e-mail: sky61@zjnu.cn

1.0 mL, $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血红蛋白溶液适量, pH 4.2 的 $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液 2.0 mL, 用水稀释至刻度, 摇匀。室温下放置 10 min 后, 以试剂空白为参比, 用 1 cm 比色皿, 在波长 537 nm 处测定溶液的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 吸收光谱及反应机理

由图 1 可见, 在 pH 4.2 的 $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液中, ARS 的吸收峰位于 421 nm, 在 ARS 溶液中加入 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子后, ARS 在 421 nm 处的吸光度减小, 460~590 nm 范围内的吸光度增大, 说明茜素红 S 与 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子反应形成了络合物; 在 $\text{Cu}(\text{II})\text{-ARS}$ 络合物溶液中定量加入 Hb, 随 Hb 加入量的增加, ARS 在 421 nm 处的吸收峰逐渐蓝移至 408 nm 且吸光度逐渐增加, 500~600 nm 范围内出现吸光度逐渐升高的递增缓峰, Hb 浓度在一定范围内与吸光度呈线性关系, 说明 Hb 与 $\text{Cu}(\text{II})\text{-ARS}$ 络合物之间发生相互作用生成了新的物质。由图 2 可见, Hb 的吸收峰位于 405 nm, 这是血红蛋白的特征吸收峰^[19], 在 Hb 溶液中加入 ARS 后, 529 nm 处产生新吸收峰, 405 nm 处的吸光度减小, 说明 Hb 与 ARS 也能发生相互作用; $\text{Cu}(\text{II})\text{-ARS}$ 络合物的吸收峰位于 509 nm, 在 $\text{Cu}(\text{II})\text{-ARS}$ 络合物溶液中加入 Hb 后, 537 nm 处产生新吸收峰, 血红蛋白特征吸收峰从 405 nm 红移至 408 nm 且吸光度减小, 说明 Hb 与 $\text{Cu}(\text{II})\text{-ARS}$ 络合物之间确实发生了相互作用。

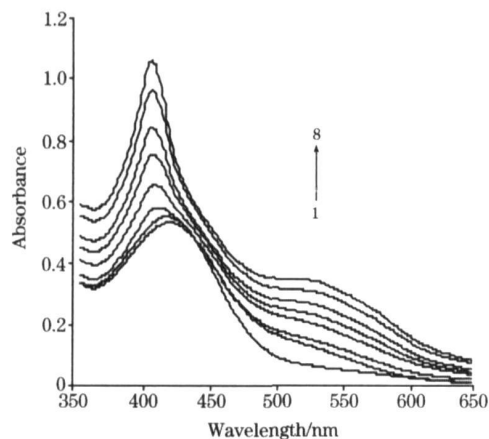


Fig 1 Absorption spectra

$c_{\text{ARS}} = 1.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

$c_{\text{Cu}(\text{II})} = 1.1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

against water;

1: ARS; 2: ARS- $\text{Cu}(\text{II})$;

3~8, ARS- $\text{Cu}(\text{II})\text{-Hb}$, $c_{\text{Hb}}/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$: 2.0×10^{-7} ; 4.0×10^{-7} ; 6.0×10^{-7} ; 8.0×10^{-7} ; 1.0×10^{-6} ; 1.2×10^{-6}

ARS 的化学式为 1,2-二羟基萘醌-3-磺酸钠, 其 $pK_{a1} = 5.4$, $pK_{a2} = 10.7$ ^[20]。在 pH 4.2 的 $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液中, ARS 的主要存在型体为 H_2R^- , 同时也存在 HR^{2-} , 带负电荷的 ARS 与 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子所形成的 $\text{Cu}(\text{II})\text{-ARS}$ 络合

物为阴离子; Hb 的等电点 pI 为 6.7, 当溶液酸度为 pH 4.2 时, Hb 肽链中碱性氨基酸残基(精氨酸、赖氨酸、组氨酸等)质子化使 Hb 成为阳离子, Hb 与 $\text{Cu}(\text{II})\text{-ARS}$ 络合物之间主要通过静电引力产生相互作用, 同时 Hb 分子与 $\text{Cu}(\text{II})\text{-ARS}$ 络合物之间疏水基团的相互吸引作用, 使得两者接近的程度增大, 导致静电引力的进一步增强, 形成了离子缔合型复合物。405 nm 处的吸收峰是血红蛋白的 Soret 谱带特征, 它的峰位不受 ARS 的影响, 但吸光度减小, 这可能是由于血红蛋白分子中卟啉的吡咯环与组氨酸的咪唑环可给予电子, ARS 可接受电子, 电子给予体与电子接受体之间的相互作用引起电荷转移, 使血红蛋白分子中铁离子与氮原子之间的配位键减弱引起吸光度减小; 而在 Hb- $\text{Cu}(\text{II})\text{-ARS}$ 复合物中, 405 nm 处吸收峰的吸光度减小, 吸收峰发生微小红移(约 3 nm), 这可能是由于 ARS 与 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子形成络合物引起的。

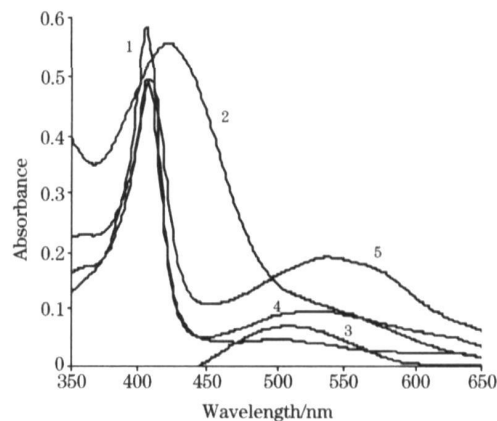


Fig 2 Absorption spectra

1: Hb (against water); 2: ARS (against water);

3: ARS- $\text{Cu}(\text{II})$ (against ARS solution);

4: ARS-Hb (against ARS solution);

5: ARS- $\text{Cu}(\text{II})\text{-Hb}$ [against ARS- $\text{Cu}(\text{II})$ solution]

$c_{\text{Hb}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{ARS}} = 1.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

$c_{\text{Cu}(\text{II})} = 1.1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.2 反应条件的影响

2.2.1 溶液酸度的影响

在体系中分别加入不同酸度的磷酸盐缓冲溶液, 试验溶液酸度对反应的影响(见图 3)。结果表明: 溶液酸度在 pH 4.0~4.7 范围内, Hb 与 $\text{Cu}(\text{II})\text{-ARS}$ 络合物反应完全, 体系的吸光度较大且恒定, 实验选择溶液酸度为 pH 4.2。

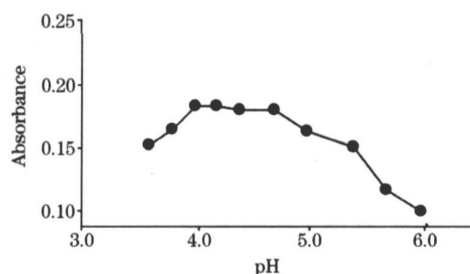


Fig 3 Effect of the solution acidity

pH 4.2 的磷酸盐缓冲溶液用量在 1.0~2.5 mL 范围内吸光度恒定, 所以实验选择 pH 4.2 $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液用量为 2.0 mL。

2.2.2 试剂用量的影响

固定体系中 Hb 与 $\text{Cu}(\text{II})$ 溶液浓度, 改变 ARS 溶液用量, 试验 ARS 溶液用量对反应的影响。结果表明: ARS 溶液用量在 0.9~2.0 mL 范围内, Hb 与 $\text{Cu}(\text{II})$ -ARS 络合物反应完全, 体系的吸光度恒定, 实验选择 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ARS 溶液用量为 1.5 mL。

固定体系中 Hb 与 ARS 溶液浓度, 改变 $\text{Cu}(\text{II})$ 溶液用量, 试验 $\text{Cu}(\text{II})$ 溶液用量对反应的影响。结果表明: $\text{Cu}(\text{II})$ 溶液用量在 0.5~4.0 mL 范围内, Hb 与 $\text{Cu}(\text{II})$ -ARS 络合物反应完全, 体系的吸光度恒定, 实验选择 $1.1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Cu}(\text{II})$ 溶液用量为 1.0 mL。

2.2.3 反应时间及温度的影响

分别试验在 15, 25, 35, 45 $^{\circ}\text{C}$ 等不同温度及不同时间下, Hb 与 $\text{Cu}(\text{II})$ -ARS 络合物的反应, 结果表明: 在不同的温度下, 体系的吸光度均在 10 min 内达到最大值, 且在 60 min 内保持不变, 60 min 后体系会出现少许沉淀, 但摇匀后吸光度仍保持不变。说明温度对该反应无影响, 反应迅速, 实验选择室温下反应 10 min 后测定体系的吸光度。

2.2.4 离子强度的影响

在反应体系中加入不同浓度的 NaCl 溶液, 试验离子强度对反应的影响。结果表明: $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液加入量在 0~3.0 mL 范围内, 体系的吸光度基本不变, 故离子强度对反应影响不大。

2.2.5 表面活性剂的影响

阳离子表面活性剂 CTMAB 使体系溶液颜色变为紫色, 体系吸光度明显降低, 且 CTMAB 无论在 Hb 前或后加入对反应的影响相同, 这是由于 CTMAB 本身带正电荷、分子比 Hb 小, 更容易与带负电荷的 $\text{Cu}(\text{II})$ -ARS 络合物发生相互

作用, 从而减弱了 Hb 与 $\text{Cu}(\text{II})$ -ARS 络合物阴离子之间的相互作用; 阴离子表面活性剂 SDBS 使体系出现沉淀, 但在没有加入 Hb 时体系无沉淀, 说明 SDBS 与质子化的 Hb 之间发生相互作用形成了离子缔合物沉淀; 非离子表面活性剂 Triton X-100 对反应无明显影响。表面活性剂的实验结果进一步说明了 Hb 与 $\text{Cu}(\text{II})$ -ARS 络合物之间主要以静电引力相结合的推断。

2.3 复合物组成

采用摩尔比法测定: 固定 ARS 溶液的浓度, 改变 $\text{Cu}(\text{II})$, Hb 溶液的浓度 ($n_{\text{Cu}(\text{II})} : n_{\text{Hb}} = 5 : 1$), 测得 ARS : $\text{Cu}(\text{II}) = 2 : 1$; 固定 Hb 溶液的浓度, 改变 ARS, $\text{Cu}(\text{II})$ 溶液的浓度 ($n_{\text{ARS}} : n_{\text{Cu}(\text{II})} = 1.8 : 1$), 测得 ARS : Hb = 8 : 1。由此可得离子缔合复合物的组成为 $n_{\text{Hb}} : n_{\text{Cu}(\text{II})} : n_{\text{ARS}} = 1 : 4 : 8$ 。

2.4 表观摩尔吸光系数

在选定的反应条件下绘制工作曲线, 结果表明: Hb 浓度在 $1.0 \times 10^{-7} \sim 2.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内与吸光度呈线性关系, 回归方程为 $A = 0.0269 + 151.675c (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$, 相关系数 $r = 0.9972$, 表观摩尔吸光系数为 $1.52 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

2.5 其他物质对反应的影响

在 10 mL 溶液中, Hb 为 6.8 mg 时, 试验了几种常见的氨基酸及金属离子对反应的影响。结果表明: 下列物质的加入量 (以 μg 计) 分别为: 色氨酸 (1000), 甘氨酸 (310), 酪氨酸 (250), 赖氨酸 (70), 精氨酸 (55), 组氨酸 (50), Mn^{2+} (2500), Ca^{2+} (200), Zn^{2+} (150), Fe^{3+} (2), Al^{3+} (1), 吸光度测定的相对误差 $\leq \pm 5\%$ 。其中赖氨酸、精氨酸、组氨酸对反应的影响较大, 这与反应机理中讨论的相符; Fe^{3+} , Al^{3+} 对反应的影响较大, 是由于这两种离子均能与 ARS 形成络合物。

参 考 文 献

- [1] Congdon R W, Muth G W, Splitterger A G. Analytical Biochemistry, 1993, 213: 407.
- [2] Pesavento M, Profumo A. Talanta, 1991, 38: 1099.
- [3] Bradford M M. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248.
- [4] YU Ying, ZHOU Zhen-tao (俞英, 周震涛). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2005, 25(4): 628.
- [5] WEI Qin, LI Yan, YU Hai-qin, et al (魏琴, 李燕, 于海琴, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry (分析化学), 2005, 33(8): 1175.
- [6] WEI Qin, LI Yan, DUAN Cai-hong, et al (魏琴, 李燕, 段彩虹, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2006, 26(1): 109.
- [7] LIU Dian-mei, LI Shu-ting, ZHAO Shu-lin (刘典梅, 李舒婷, 赵书林). Chinese Journal of Analytical Chemistry (分析化学), 2004, 32(2): 187.
- [8] DU Bin, LI Yan, ZHANG Hui, et al (杜斌, 李燕, 张慧, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2005, 25(7): 1110.
- [9] LIU Hai-ping, WANG Xing-ming, DAI Ya-tang, et al (刘海萍, 王兴明, 戴亚堂, 等). Chinese Journal of Inorganic Chemistry (无机化学学报), 2005, 21(9): 1422.
- [10] WANG Jing-yan, ZHU Sheng-geng, XU Chang-fa (王镜岩, 朱圣庚, 徐长法). Biochemistry (生物化学). Beijing: Higher Education Press (北京: 高等教育出版社), 2002. 257.
- [11] YE Bao-xian, ZHOU Xing-yao (冶保献, 周性尧). Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报), 1996, 17(1): 33.

- [12] HUANG Ying-ping, CAI Ru-xiu(黄应平, 蔡汝秀). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2001, 29(4): 378.
- [13] WANG Quan-lin, LÜ Gong-xuan(王全林, 吕功煊). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2003, 31(8): 945.
- [14] WANG Quan-lin, LIU Zhi-hong, YUAN Hong, et al(王全林, 刘志洪, 原 弘, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2001, 29(4): 421.
- [15] HUANG Ying-ping, LIU Feng, CHEN Bai-ling, et al(黄应平, 刘 丰, 陈百玲, 等). Chinese Journal of Analysis Laboratory(分析试验室), 2003, 22(1): 12.
- [16] FENG Yue-ying, WU Xiao-hong, ZHOU Jia-hong, et al(冯玉英, 吴晓红, 周家宏, 等). Applied Chemistry(应用化学), 2005, 22(8): 895.
- [17] YANG Pei-hui, ZHENG Zhi-wen, CAI Ji-ye(杨培慧, 郑志雯, 蔡继业). Chinese Journal of Luminescence(发光学报), 2004, 25(3): 247.
- [18] ZHENG Zhi-wen, YANG Pei-hui, FENG De-xiong, et al(郑志雯, 杨培慧, 冯德雄, 等). Journal of Jinan University(Natural Science)(暨南大学学报·自然科学版), 2003, 24(5): 106.
- [19] White A, Handler P, Smith E L. Principles of Biochemistry(生物化学原理). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1978. 110.
- [20] KE Yi-kan, DONG Hu-i ru(柯以侃, 董慧茹). The Handbook of Analysis Chemistry(Spectral Analysis)(分析化学手册·第三分册 光谱分析). The Second Edition(第2版). Beijing: Chemical Industrial Press(北京: 化学工业出版社), 1998. 773.

Study on the Interaction of Hemoglobin and Cu(II)-ARS Complex

WU Xiao-hua, MIAO Ji-gen, MIAO Yu-qing, CHEN Jian-rong

College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

Abstract The reaction of hemoglobin (Hb) with copper(II)-Alizarin red S (ARS) complex was studied in $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ buffer solution (pH 4.2) by ultraviolet-visible spectrophotometry. The results show that the interaction of Hb and Cu(II)-ARS complex produces red ionic association complex with its maximum absorption peak at 537 nm. At the maximum absorption, the composition of the complex was determined to be $n_{\text{Hb}} : n_{\text{Cu(II)}} : n_{\text{ARS}} = 1 : 4 : 8$, and the apparent molar absorptivity was $1.52 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. The concentration of Hb is linear with the absorbency in the range of $1.0 \times 10^{-7} \sim 2.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and the regression equation was established as $A = 0.0269 + 151.675c (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ with the coefficient $r = 0.9972$. The effects of solution acidity, reagent amount, reaction time, temperature, ionic strength and the added surfactant were examined on the formation of the Hb-Cu(II)-ARS complex. A preliminary investigation was carried out to elucidate the reaction mechanism, and it could be concluded that the Hb and Cu(II)-ARS complex are combined mainly by electrostatic attraction. Further investigation was also undertaken to find out the effects of common amino acids and metallic ions on the formation of Hb-Cu(II)-ARS complex.

Keywords Hemoglobin; Copper(II)-alizarin red S complex; Ultraviolet-visible spectrophotometry

(Received Dec. 9, 2006; accepted Apr. 24, 2007)