

荧光法研究四(对甲氧基苯基)钴卟啉 与牛血清白蛋白的相互作用

吕艳阳 翟秋阁 李雪 陈伟霞

(信阳师范学院化学化工学院 河南省信阳市长安路 237 号 464000)

摘 要 合成了四(对甲氧基苯基)钴卟啉,利用荧光光谱法研究了四(对甲氧基苯基)钴卟啉与牛血清白蛋白的相互作用,由实验数据计算求得该卟啉与牛血清白蛋白的双分子猝灭过程速率常数 $K_q = 9.619 \times 10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 、结合常数 $K_A = 3.475 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、结合数 $n = 0.6893$,结果表明:四(对甲氧基苯基)钴卟啉与牛血清白蛋白之间发生了较强的静态荧光猝灭作用。

关键词 四(对甲氧基苯基)钴卟啉;牛血清白蛋白;荧光光谱;静态猝灭

中图分类号:O 657.32 文献标识码:A 文章编号:1004-8138(2010)03-1168-04

1 引言

卟啉化合物广泛存在于自然界的生命体中,如叶绿素、血红素、维生素 B_{12} 等,卟啉分子的特殊刚性大电子离域结构以及易形成金属卟啉的性质使得卟啉参与生命现象中 O_2 、 CO_2 的传输和光合作用等生物物理过程,它们在生命过程中对氧的传递、贮存、活化和光合作用等起着十分重要的作用。有关蛋白质的各类研究是当前生命科学、药学、化学及临床医学研究中所共同感兴趣的课题^[1,2]。血清白蛋白是血浆中最为丰富的蛋白质,含有多种可配位基团能与体内许多物质作用,卟啉化合物进入人和动物机体后,可与血清白蛋白结合,其体内聚集状态及在机体中的分布、代谢等生理过程都受到血清白蛋白的影响。对卟啉化合物与蛋白质之间的相互作用研究有助于了解其在血液中的存在形式,从而探索其抗癌机制,并为设计卟啉类新型抗癌药物提供有益的信息^[3,4]。因此,金属卟啉与血清白蛋白的相互作用研究,已引起了人们的极大兴趣^[5]。本文以对甲氧基苯甲醛与吡咯为原料,丙酸为溶剂,氯乙酸为催化剂合成了四(对甲氧基苯基)卟啉及其钴配合物,利用 UV-Vis, IR, $^1\text{H NMR}$ 及元素分析对其结构进行了表征,利用荧光法研究了四(对甲氧基苯基)钴卟啉对牛血清白蛋白荧光光谱的影响,从而初步探索其猝灭机理。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Cintra 10 型紫外可见分光光度计(澳大利亚GBC 科学仪器公司);NEXUS 470 红外光谱仪(美国Nicolet 公司),条件:温度 24°C ,湿度67%,分辨率 4cm^{-1} ,DTGS 检测器;BRUKER AvanceDPX-400 兆赫超导核磁共振谱仪(瑞士Bruker 公司),条件:溶剂为氘代氯仿,四甲基硅烷(TMS)为内标,谱宽30ppm,观测频率400.162MHz;Vario EL III型元素分析仪(德国Elementer 公司),条件:燃烧管温度 1150°C ,还原管温度 850°C ;Cary Eclipse 型荧光分光光度计(美国瓦里安公司)。

联系人,电话:(0376)6390702;E-mail:yanyang632@126.com

作者简介:吕艳阳(1963—),女,河南省信阳市人,教授,主要从事光谱研究工作。

收稿日期:2009-09-28;接受日期:2009-10-25

对甲氧基苯甲醛、吡咯(瑞士Fluka Chemika公司)、丙酸, *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、甲醇、三氯甲烷、乙酸钴、三(羟甲基)氨基甲烷, 以上试剂均为分析纯; 氯乙酸(化学纯), 中性 Al_2O_3 (100—200目); 牛血清白蛋白(BSA, 分子量65000)。实验用水为二次蒸馏水。

2.2 配制溶液

牛血清白蛋白储备液: $1.003 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水溶液, 工作液为 $1.003 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 四(对甲氧基苯基) 钴卟啉(TMOPPCo) 储备液: $8.588 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DMF 溶液, 工作液为 $8.588 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $8.588 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 以上溶液均置于1-4℃冰水浴中保存。三(羟甲基)氨基甲烷(Tris): $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水溶液; HCl: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水溶液。

2.3 四(对甲氧基苯基) 卟啉及钴卟啉的合成

向安装有电动搅拌器、滴液漏斗、回流冷凝管和温度计的250mL的四口烧瓶中加入150mL丙酸及少量氯乙酸, 电炉加热。瓶中液体沸腾后, 开始自滴液漏斗滴入2.1mL(0.03 mol)吡咯(新蒸馏)和3.8mL(0.03 mol)对甲氧基苯甲醛的混合液, 5min内滴完, 溶液颜色由无色—淡红色—红色—深红色—紫黑色, 逐渐加深, 反应温度为141℃。继续加热搅拌回流2h, 移去加热装置, 自然冷却至室温, 抽滤, 并用水洗涤固体数次, 烘干。经薄层层析(TLC)检测为单一组分, 用柱层析纯化(CHCl_3 洗脱, 100—200目 Al_2O_3), 得蓝紫色固体, 产率23.6%。经UV-Vis、IR、 $^1\text{H NMR}$ 和元素分析表征确认为四(对甲氧基苯基) 卟啉 $\text{C}_{48}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_4$ (TMOPP)。

向250mL三颈烧瓶中加入0.148g四(对甲氧基苯基) 卟啉和0.150g $\text{Co}(\text{OAc})_2$, 并加入100mL DMF为溶剂, 搅拌使固体物质溶解, 加热回流100min。薄板追踪, 当卟啉完全反应后, 蒸出约80mL DMF, 停止加热, 余液冷至室温后倾入200mL水中, 静置1h, 抽滤, 用大量水洗涤, 烘箱120℃干燥4h, 得产品, 产率为95.98%。经UV-Vis、IR、 $^1\text{H NMR}$ 和元素分析表征确认为四(对甲氧基苯基) 钴卟啉 $\text{C}_{48}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_4\text{Co}$ (TMOPPCo)。

2.4 实验方法

在10mL的比色管中, 依次加入适量的四(对甲氧基苯基) 钴卟啉(TMOPPCo)溶液1.5mL、HCl和1.0mL Tris, BSA工作液1.0mL, 并用水稀释至10mL。混匀10min后于荧光光谱仪上扫描其荧光激发和发射光谱, 并记录发射波长 $\lambda_m = 280 \text{ nm}$ 、激发波长 $\lambda_x = 337 \text{ nm}$ 处的荧光强度 F 。

3 结果与讨论

3.1 TMOPPCo与BSA的荧光光谱

按2.4实验方法配制溶液, 固定BSA的浓度, 改变四(对甲氧基苯基) 钴卟啉的浓度, 扫描荧光光谱。图1中A为荧光激发光谱, 其中曲线a为BSA的荧光激发光谱; B为荧光发射光谱。由图1可知, BSA有两个荧光激发峰227nm和280nm。若以280nm为激发波长, 随着BSA中加入的TMOPPCo浓度逐渐增大, 体系的荧光激发峰逐渐降低; 若以227nm为激发波长, BSA中加入TMOPPCo后, 体系的荧光激发峰几乎消失, 并且与TMOPPCo的浓度几乎无关。因此选择280nm为荧光发射波长。由图1中B可看出, TMOPPCo

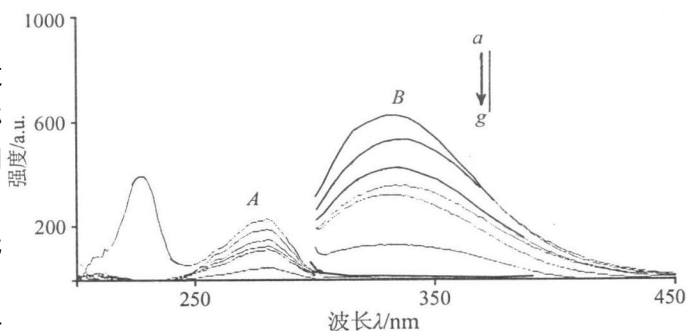


图1 样品的荧光光谱

$C(\text{BSA}) = 1.003 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 从a到g曲线表示四(对甲氧基苯基) 钴卟啉的浓度分别为: $0, 4.294 \times 10^{-7}, 2.576 \times 10^{-6}, 4.294 \times 10^{-6}, 8.588 \times 10^{-6}, 2.576 \times 10^{-5}, 4.294 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

对BSA 有较强的荧光猝灭作用。

3.2 TMOPPCo 与 BSA 的相互作用

牛血清白蛋白的内源荧光来自于分子中色氨酸残基和酪氨酸残基,金属卟啉的加入能使其荧光规律性猝灭。荧光猝灭过程通常有动态和静态猝灭两种,动态猝灭是猝灭剂与荧光激发态分子之间的相互作用过程。静态猝灭是由于猝灭剂与荧光体分子在基态形成不发光的配合物或分子间复合物,从而导致的荧光体发光强度降低的过程。动态猝灭遵从Stern-Volmer 方程^[6]:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 C = 1 + K_{sv} C \quad (1)$$

式中: K_q ($L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$) —— 双分子猝灭过程速率常数; τ_0 —— 无猝灭剂时生物大分子的平均寿命 $\tau_0 = 10^{-8} s$; K_{sv} ($L \cdot mol^{-1}$) —— Stern-Volmer 猝灭常数; F_0 —— 未加入猝灭剂时牛血清白蛋白的荧光强度; F —— 加入猝灭剂四(对甲氧基苯基)钴卟啉后牛血清白蛋白的荧光强度; C ($mol \cdot L^{-1}$) —— 四(对甲氧基苯基)钴卟啉的浓度。

如图1所示为四(对甲氧基苯基)钴卟啉与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱曲线。牛血清白蛋白一般有两个紫外吸收峰: 210nm 附近的吸收峰主要由肽键上的羰基 $n \rightarrow \pi^*$ 电子跃迁产生, 278nm 附近的吸收峰由BSA 中色氨酸和酪氨酸残基的芳环 $\pi \rightarrow \pi^*$ 产生^[7]。由此可知, 图1中A 的曲线a 为BSA 的荧光激发光谱, 其中227nm 为肽键上的羰基 $n \rightarrow \pi^*$ 电子跃迁产生, 280nm 为BSA 中色氨酸和酪氨酸残基的芳环 $\pi \rightarrow \pi^*$ 产生。当四(对甲氧基苯基)钴卟啉TMOPPCo 加入, 以227nm 为荧光发射波长时, BSA 中加入TMOPPCo, 体系的荧光激发峰几乎消失, 与TMOPPCo 的浓度大小无关, 只可得到BSA 的荧光发射光谱。由此可知, 以227nm 为荧光发射波长时, TMOPPCo 作为猝灭剂可能与BSA 荧光体激发态分子之间相互作用, 产生了动态猝灭; 以280nm 为荧光发射波长时, 随着BSA 中加入的TMOPPCo 浓度逐渐增大, 体系的荧光激发峰逐渐降低, 可得图1中B 曲线荧光发射光谱, 此时TMOPPCo 猝灭剂可能与BSA 在基态时生成了不发光的复合物, 从而导致荧光体荧光强度降低, 产生了静态猝灭。

为确认TMOPPCo 对BSA 荧光猝灭的机理, 按照图1中B 的各曲线在 $\lambda_{ex} = 337nm$ 处的荧光强度, 利用(1)式对各实验结果进行处理, 得TMOPPCo 对BSA 荧光猝灭的Stern-Volmer 图(图2), 得拟合直线方程为:

$$F_0/F = 1.194 + 9.619 \times 10^4 C, r = 0.9961$$

即 Stern-Volmer 猝灭常数 $K_{sv} = 9.619 \times 10^4$ ($L \cdot mol^{-1}$), 双分子猝灭过程速率常数 $K_q = 9.619 \times 10^{12}$ ($L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$)。根据Stern-Volmer 方程计算得到四(对甲氧基苯基)钴卟啉对牛血清白蛋白的荧光猝灭Stern-Volmer 曲线均有良好的线性关系, 这是静态猝灭的迹象之一, 由于各类猝灭剂对生物大分子最大扩散控制的碰撞猝灭常数为 $2.0 \times 10^{10} L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ ^[8], 而本文得到的 K_q 远大于这一数值, 说明四(对甲氧基苯基)钴卟啉对牛血清白蛋白的荧光猝灭并非分子间动态碰撞所致, 而是形成复合物所引起的静态猝灭^[9]。

3.3 TMOPPCo 与 BSA 的结合常数 K_A 和结合数 n

在静态猝灭中, 可以利用何锡文等^[10]推导的下列公式求出TMOPPCo 与BSA 相互作用的结合常数 K_A 和结合数 n 。

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

式中: K_A —— 结合常数; n —— 结合数; Q —— TMOPPCo 分子。由图1B 曲线读取 $\lambda_{ex} = 337nm$ 处的荧光强度, 利用(2)式进行处理, 得TMOPPCo 浓度与BSA 荧光强度的关系图(图3)及拟合方程:

$$\lg F / (F_0 - F) = -3.541 + 0.6893 \lg 1 / [Q], r = 0.9935$$

由此可算出结合常数 $K_A = 3.475 \times 10^3 L \cdot mol^{-1}$, 结合数 $n = 0.6893$ 。

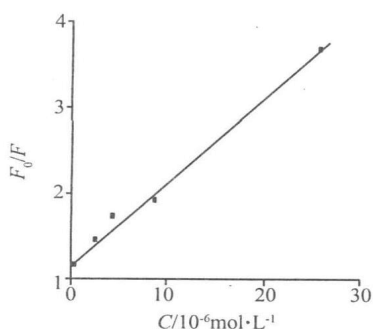


图 2 TMOPPCo 对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图

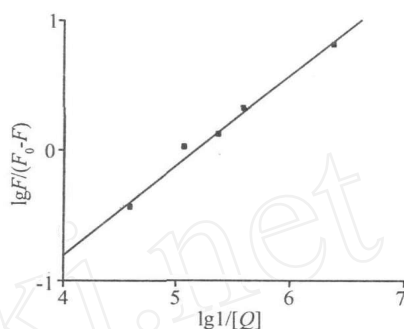


图 3 TMOPPCo 浓度与 BSA 荧光强度的关系图

4 结论

通过对四(对甲氧基苯基)钴卟啉与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱的研究,发现四(对甲氧基苯基)钴卟啉对牛血清白蛋白的荧光具有良好的猝灭作用,该猝灭过程为静态猝灭,其猝灭常数为 $K_{sv} = 9.619 \times 10^{12} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。四(对甲氧基苯基)钴卟啉与牛血清白蛋白的结合常数 $K_A = 3.475 \times 10^3 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 结合数 $n = 0.6893$ 。该卟啉化合物中电负性较大的 O、N 原子,可与蛋白质分子中位置合适的某些酰胺基团形成氢键,还有金属与牛血清白蛋白的氨基酸残基中的 N、O 和 S 形成复合物的范德华力等,其作用机理有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Congdon R W, Muth G W, Splittgerber A G. The Binding Interaction of Coomassie Blue with Proteins[J]. *J. Anal. Biochem.*, 1993, **213**(11): 407.
- [2] You W W, Haugland R P, Ryan D K *et al*. 3-(4-Carboxybenzoyl) Quinoline-2-Carboxaldehyde, a Reagent with Broad Dynamic Range for the Assay of Proteins and Lipoproteins in Solution[J]. *J. Anal. Biochem.*, 1997, **244**(9): 277.
- [3] Sessler J L, Murai T, Lynch V. The Synthesis and Structure of a New Aromatic Pentadentate Ligand[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**(16): 5586.
- [4] 乐加昌, 庞素珍. 类卟啉稀土配合物对于小鼠腹水肝癌细胞光敏损伤的研究[J]. *生物物理学报*, 1994, **10**(4): 634.
- [5] 张红霞, 刘建业, 李青山. 四苯基卟啉锰配合物与牛血清白蛋白相互作用的研究[J]. *山西医科大学学报*, 2001, **32**(2): 138.
- [6] 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓等. 荧光分析法[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1990.
- [7] 梁彦秋, 藏树良, 赵雷. 邻苯二酚与牛血清白蛋白的相互作用[J]. *化学应用与研究*, 2009, **21**(2): 155.
- [8] 朱铿, 童沈阳. 吡啶酸、氟哌酸与 HSA、IgG 相互作用的研究[J]. *化学学报*, 1997, **55**(4): 405.
- [9] 陈春桥, 王星, 侯安新. 锌(II) 钡(II) 双卟啉的合成及其与牛血清白蛋白的相互作用[J]. *武汉大学学报*, 2006, **52**(4): 405.
- [10] 冯喜赠, 金瑞祥, 何锡文等. 各种离子对血卟啉与牛血清白蛋白相互结合反应的影响研究[J]. *高等学校化学学报*, 1996, **17**(6): 866.

Interaction of Meso-Tetramethoxyphenyl Porphyrin Cobalt Complexes with Bovine Serum Albumin by Fluorescence

LV Yan-Yang ZHAI Qiu-Ge LI Xue CHEN Wei-Xia

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Xinyang Normal University, Xinyang, Henan 464000, P. R. China)

Abstract Meso tetramethoxyphenyl porphyrin cobalt complexes were synthesized. The interaction between meso tetramethoxyphenyl porphyrin cobalt complexes and bovine serum albumin (BSA) was observed by fluorescence spectrum. The quenching rate constant and the binding constant and the combination number was calculated according to the data: $K_q = 9.619 \times 10^{12} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $K_A = 3.475 \times 10^3 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $n = 0.6893$. The product has strong ability of quenching the fluorescence of BSA. The quenching belongs to static quenching.

Key words Meso Tetramethoxyphenyl Porphyrin Cobalt; Bovine Serum Albumin; Fluorescence Spectroscopy; Static Quenching