

## 邻菲咯啉乳酸镍配合物的合成与表征及其与牛血清白蛋白相互作用的荧光分析

林海彬<sup>1,2</sup> 张美鑫<sup>1</sup> 林凉凉<sup>1</sup> 周朝晖<sup>\*3</sup>

(<sup>1</sup>漳州师范学院化学与环境科学系,漳州 363000)

(<sup>2</sup>漳州师范学院分析科学省高校重点实验室,漳州 363000)

(<sup>3</sup>厦门大学固体表面物理化学国家重点实验室,厦门 361005)

**摘要:** 利用溶液法合成了配合物 $[\text{Ni}(\text{Hlact})_2(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}(\mathbf{1})$ , 并对该配合物进行了元素分析、红外光谱和 X-射线单晶衍射表征。通过荧光光谱法研究了不同温度下配合物 **1** 与牛血清白蛋白相互作用时的荧光强度的变化, 计算了在不同温度下, 配合物 **1** 与牛血清白蛋白(BSA)的结合常数、结合位点数以及热力学函数, 并进一步讨论了配合物 **1** 与 BSA 相互作用时的作用力类型和两者之间的距离。结果表明, 配合物 **1** 对牛血清白蛋白的荧光猝灭为静态猝灭过程, 它与牛血清白蛋白的相互作用有一个位点, 结合常数的平均值  $5.06\times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 作用距离为 2.35 nm, 相互作用力表现为氢键和范德华力。

**关键词:** 牛血清白蛋白; 荧光光谱; 乳酸; 邻菲咯啉; 镍配合物

中图分类号: O641.4; O614.81+3 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2013)11-2315-08

DOI:10.3969/j.issn.1001-4861.2013.00.225

## Synthesis and Characterization of $[\text{Ni}(\text{Hlact})_2(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and Its Interaction with BSA Studied by Fluorescence Spectroscopy

LIN Hai-Bin<sup>1,2</sup> ZHANG Mei-Xin<sup>1</sup> LIN Liang-Liang<sup>1</sup> ZHOU Zhao-Hui<sup>\*3</sup>

(<sup>1</sup>Department of Chemistry, Zhangzhou Teachers College, Zhangzhou, Fujian 363000, China)

(<sup>2</sup>Fujian Province University Key Laboratory of Analytical Science (Zhangzhou Normal University), Zhangzhou, Fujian 363000, China)

(<sup>3</sup>State Key Laboratory for Physical Chemistry of Solid Surfaces, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

**Abstract:** The compound  $[\text{Ni}(\text{Hlact})_2(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  is synthesized in the solution and fully characterized by elemental analysis, IR and X-ray structural analyses. The interaction of Bovine Serum Albumin (BSA) and  $[\text{Ni}(\text{Hlact})_2(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  at different temperatures are investigated with fluorescence spectra. The binding constant, binding sites and thermodynamic functions are calculated at different temperatures. The binding force and distance are discussed for BSA with complex **1**. In the result, the model of fluorescence quenching is considered as static quenching process based on Stern-Volmer equation. The binding constant and binding sites are calculated for BSA and  $[\text{Ni}(\text{Hlact})_2(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  as  $5.06\times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$  and 2.35nm respectively. Parameters of thermodynamic functions are calculated and the interaction is determined as hydrogen bonding and van der Waal interactions between BSA and complex. CCDC: 897985.

**Key words:** bovine serum albumin (BSA); fluorescence spectrum; lactic acid; phenanthroline; nickel complex

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、基因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

收稿日期: 2012-08-26。收修改稿日期: 2013-02-03。

国家自然科学基金(No.21073150)资助项目。

\*通讯联系人。E-mail: zhzhou@xmu.edu.cn, Tel: 0592-2184531

中心等<sup>[1-4]</sup>。而蛋白质是生物体的重要组成之一,其对生物体内 pH 值的调整,或对金属离子、氨基酸及药物等的贮存及运载等有重要作用<sup>[5-6]</sup>。利用蛋白质光谱探针(金属离子、有机试剂和金属络合物等)与蛋白质相互作用生成超分子复合物并引起体系光谱信号的变化<sup>[7-13]</sup>,有望从分子水平上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。而乳酸是糖的代谢的主要产物之一,机体中所有的组织都有糖酵解产生乳酸的能力,它广泛存在于人体、动物及微生物代谢之中,在人和哺乳动物体内起着调节肌肉活动和抗疲劳的作用<sup>[14-16]</sup>。因此,开展乳酸体系的配合物与蛋白质相互作用的研究,对研究乳酸在人体内的生物活性,具有一定的参考价值。在前文中,我们曾经利用紫外和红外光谱法研究了乳酸钴配合物与牛血清白蛋白(BSA=Bovine Serum Albumin)的相互作用,结果显示乳酸或邻菲咯啉配体可能被 BSA 中的强配体所取代<sup>[17]</sup>。本文进一步合成并表征了邻菲咯啉乳酸镍配合物 $[\text{Ni}(\text{Hlact})_2(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}(\mathbf{1})$ (乳酸= $\text{H}_2\text{lact}$ ; 1,10-邻菲咯啉= $\text{phen}$ ),利用荧光光谱法分析了配合物 **1** 与牛血清白蛋白相互作用。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

所有化学试剂为分析纯试剂,乳酸为 S 构型,牛血清白蛋白为赛宝生物科技有限公司生产,Tris-HCl 缓冲溶液(pH 为 6.8)的浓度为  $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。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 $[\text{Ni}(\text{Hlact})_2(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}(\mathbf{1})$ 的合成

将  $10.0\text{ mmol NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  和  $10.0\text{ mmol 1,10-phen}$  溶于  $20.0\text{ mL}$  蒸馏水中,搅拌至完全溶解,得到溶液(1);将  $20.0\text{ mmol}$  乳酸溶于  $10\text{ mL}$  的水溶液中,并用氢氧化钠调节溶液的 pH 值至 6~7,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,析出蓝色晶体  $1.84\text{ g}$ ,产率 40.6%。对该晶体进行元素分析及红外表征,测定值(%): C, 47.3; H, 4.4; N, 6.5。理论值(%): C, 47.7; H, 4.9; N, 6.2。IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{\text{phen}}\text{C}=\text{C}$   $1\ 653_{\text{s}}$ ;  $\nu_{\text{as}}(\text{CO}_2)$   $1\ 579_{\text{vs}}$ ;  $\nu_{\text{s}}(\text{CO}_2)$   $1\ 423_{\text{s}}$ ,  $1\ 388_{\text{s}}$ ;  $\delta_{\text{phen}}(\text{C}-\text{H})$   $851_{\text{s}}$ ;  $\nu_{\text{s}}(\text{Ni}-\text{O})$   $732_{\text{m}}$ ,

$688_{\text{w}}$ ,  $544_{\text{w}}$ 。

#### 1.2.2 配合物 $[\text{Ni}(\text{Hlact})_2(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}(\mathbf{1})$ 与 BSA 相互作用的红外测定

称取  $0.32\text{ g}$  配合物 **1** 固体溶于 pH 值为 6.8 的 Tris-HCl 缓冲溶液中,然后加入  $0.25\text{ g}$  BSA,搅拌均匀后静置,几天后析出少量蓝色固体,过滤,用甲醇洗涤并烘干后,用 KBr 压片,由 Nicolet360 光谱仪进行测定。

#### 1.2.3 配合物 $[\text{Ni}(\text{Hlact})_2(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}(\mathbf{1})$ 与 BSA 相互作用的荧光测定

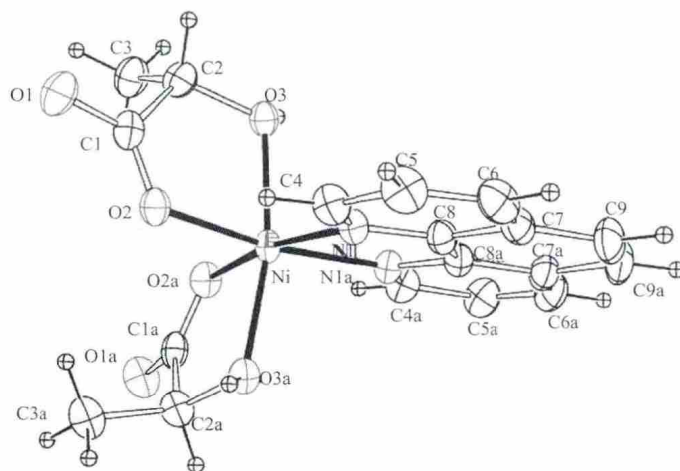
用 Tris-HCl 缓冲溶液(pH=6.8)配制浓度为  $1.0\times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 BSA 溶液,然后于一系列  $10.00\text{ mL}$  的容量瓶中加入  $1.00\text{ mL}$  的 BSA 溶液,并加入不同体积的配合物 **1** 溶液,定容。以  $\lambda=280\text{ nm}$  为激发波长,记录  $300\sim 400\text{ nm}$  范围的荧光光谱;同时测定  $\Delta\lambda=15\text{ nm}$  和  $\Delta\lambda=60\text{ nm}$  时的同步荧光光谱。将该系列溶液分别于  $20, 25, 30$  和  $35\text{ }^\circ\text{C}$  下反应  $5\text{ min}$  后,以  $\lambda=280\text{ nm}$  为激发波长,记录  $300\sim 400\text{ nm}$  范围内的荧光光谱。

## 2 结果与讨论

### 2.1 配合物 **1** 的结构分析

选取  $0.31\text{ mm}\times 0.13\text{ mm}\times 0.19\text{ mm}$  大小的晶体置于毛细管上用于单晶衍射实验,使用 Bruker Smart Apex CCD 单晶衍射仪 (Mo  $K\alpha$ ,  $\lambda=0.071\ 073\text{ nm}$ , 石墨单色器),在  $2.62^\circ\sim 28.41^\circ$  范围内收集  $10\ 591$  个独立衍射点,其中  $I\geq 2\sigma(I)$  的  $2297$  个衍射点用于结构解析和最小二乘修正,强度数据经  $L_p$  因子和经验吸收校正。配合物的晶体结构如图 1 所示,其晶体结构数据和键长键角数据分别如表 1 和 2 所示。

配合物 **1** 的结构如图 1 所示,在该配合物中,镍离子分别与 1 个邻菲咯啉分子上的 2 个氮原子和 2 个乳酸分子上的羟基和羧基氧原子形成配位键,形成扭曲的八面体结构。其中邻菲咯啉上的 2 个氮原子(N1, N1a)、2 个乳酸分子上的羧基氧原子(O2, O2a)与镍离子构成了这个八面体的赤道平面。而 2 个乳酸分子上的 2 个羟基氧原子(O3 和 O3a)分别位于八面体的 2 个轴向位置上,它们与镍离子形成了  $168.0(1)^\circ$  的二面角。参与配位的 2 个乳酸分子均为 S 构型,它们与镍离子及邻菲咯啉分子形成绝对构型为的八面体配合物,其基本结构特征与  $[\text{M}(\text{Hlact})_2(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (M=Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>)<sup>[18]</sup> 配合物的特征相似。



Symmetry code: a: 1.5-x, 1.5-y, z.

图 1 配合物 $[Ni(Hlact)_2(phen)] \cdot 2H_2O$  (1)的分子结构图

Fig.1 Perspective view of the molecular structure for  $[Ni(Hlact)_2(phen)] \cdot 2H_2O$  (1)

表 1 配合物 $[Ni(Hlact)_2(phen)] \cdot 2H_2O$  (1)的晶体结构数据

Table 1 Crystal data summaries of intensity data collections and structural refinements for complex 1

Empirical formula	$C_{18}H_{24}N_2O_8Ni$	Formula units/unit cell	8
Formula weight	455.1	$D_c / (g \cdot cm^{-3})$	1.58
Temperature / K	293	$F(000)$	1 904
Crystal color	blue	Reflections	10 567/2 294
Crystal size / mm	0.32×0.21×0.11	Collected/unique/ $R_{int}$	0.0302
Crystal system	Orthorhombic	Data/restraints/parameters	2294/5/142
Cell constants:		$\theta$ range / (°)	2.62 to 28.41
$a / nm$	1.313 1(4)	Goodness-of-fit on $F^2$	1.148
$b / nm$	2.840 2(7)	$R_1, wR_2 (I > 2\sigma(I))$	0.044 4, 0.101 0
$c / nm$	1.025 7(2)	$R_1, wR_2$ (all data)	0.046 0, 0.102 8
$V / nm^3$	3.825(2)	Largest diff. peak and hole / ( $e \cdot nm^{-3}$ )	750 and -239
Space group	$Fdd2$		

表 2 配合物 $[Ni(Hlact)_2(phen)] \cdot 2H_2O$  (1)的部分键长(nm)和键角(°)

Table 2 Selected bond lengths (nm) and angles (°) in complex 1

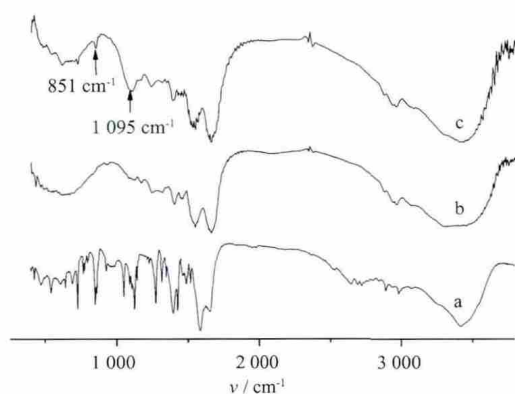
Ni-O(2)	0.2012(2)	Ni-N(1)	0.2079(3)	Ni-O(3)	0.2056(2)
O(2)-Ni-O(2a)	95.4(2)	O(3)-Ni-O(3a)	167.9(1)	O(2)-Ni-O(3)	79.2(1)
O(3)-Ni-N(1a)	94.8(1)	O(2)-Ni-O(3a)	92.6(1)	N(1)-Ni-N(1a)	79.2(2)
O(2)-Ni-N(1)	93.2(1)	O(3)-Ni-N(1)	94.5(1)	O(2)-Ni-N(1a)	169.8(1)

Symmetry code: a: 1.5-x, 1.5-y, z.

## 2.2 配合物 1 与牛血清白蛋白相互作用的红外光谱表征

利用 Nicolet360 光谱仪对 BSA, 配合物 1 及 BSA 与配合物 1 相混合后的析出物进行红外光谱表征,结果如图 2 所示。

如图 2 所示,配合物 1(曲线 a)和牛血清白蛋白(曲线 b)相互作用后,其析出产物的红外谱图如曲线 c 所示。对比曲线 c 与曲线 b,它们之间较大的差别在于曲线 c 在  $851 \text{ cm}^{-1}$  处有个较弱的吸收峰以及  $1 095 \text{ cm}^{-1}$  处有个中等强度的吸收峰,而在曲线 a



a: complex 1; b: BSA; c: complex 1+BSA

图 2 配合物 1 与 BSA 相互作用后析出物的红外光谱图

Fig.2 IR spectra for the interaction between complex 1 and BSA

中, 851 及 1 095  $\text{cm}^{-1}$  处也均有强吸收峰, 该现象初步表明: 当配合物 1 与 BSA 相混合后, 它们之间形成了某一稳定的复合物, 而且该复合物中含有一定比例的邻菲咯啉化合物; 同时对比曲线 a 及曲线 c 之间吸收峰的差异, 发现在曲线 c 上乳酸在 1 600 及 1 400  $\text{cm}^{-1}$  附近的特征伸缩振动吸收峰被抑制。因此, 可以初步推测配合物 1 与 BSA 相互作用后, 配合物上的乳酸配体部分或全部被 BSA 所取代, 从而形成了新的复合物。该结果与文献<sup>[17]</sup>的实验结果相吻合。

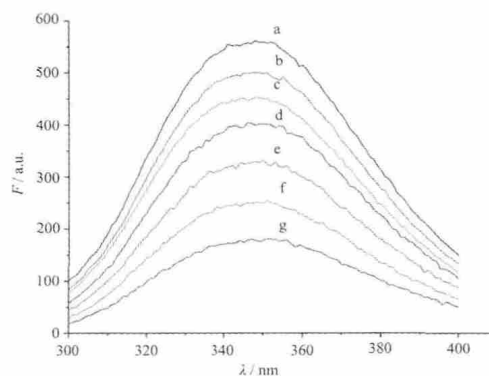
### 2.3 配合物 1 与牛血清白蛋白相互作用的荧光表征

固定牛血清白蛋白的浓度为  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 改变配合物 1 的浓度, 并以 280 nm 的激发波长分别激发 BSA 溶液及 BSA 与配合物 1 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 3 所示。

当激发波长为 280 nm 时, 配合物 1 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<sup>[19]</sup>。因此, 固定 BSA 的浓度不变, 依次加入不同浓度的配合物 1, 随着配合物浓度的逐渐增加, BSA 在 350 nm 附近的荧光发射峰强度有规律地减弱, 其结果如图 3 所示, 该特征的出现初步表明配合物 1 与 BSA 发生了一定程度的作用。

### 2.4 配合物 1 对牛血清白蛋白的荧光猝灭方式的分析

荧光猝灭是猝灭剂与荧光体激发态分子之间的相互作用的结果, 猝灭过程通常有动态和静态猝灭



From a to g,  $c_1/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ : 0, 10, 15, 25, 40, 60, 100, respectively

图 3 不同浓度配合物 1 对 BSA 溶液荧光光谱的影响结果

Fig.3 Fluorescence spectra of BSA influenced by different concentrations of complex 1

之分, 它们均遵从 Stern-Volmer 方程:  $F_0/F = 1 + k_q \tau_0 C_Q = 1 + k_{sv} C_Q$ , 式中,  $F_0$  和  $F$  分别为未加及加入猝灭剂时 BSA 的相对荧光强度;  $k_q$  为双分子猝灭过程的速率常数;  $\tau_0$  为无猝灭剂存在时荧光分子的平均寿命, 通常取值  $10^{-8} \text{ s}$ ;  $k_{sv}$  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;  $C_Q$  为猝灭剂的摩尔浓度<sup>[20-22]</sup>。

而区分动态猝灭与静态猝灭的主要依据之一是: 动态猝灭主要是依赖于分子的扩散, 增加温度导致扩散速度加快, 猝灭常数将随着温度的升高而增大; 而静态猝灭, 温度升高, 将导致配合物的稳定性降低, 静态猝灭常数的值将随温度的升高而减小<sup>[22]</sup>。

因此, 根据 Stern-Volmer 方程, 取 BSA 与配合物 1 的混合体系在不同温度时荧光发射光谱的 350 nm 处的相对荧光强度为  $F$ , 以  $(F_0/F - 1)$  与所加入的配合物 1 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 4 所示; 由 Stern-Volmer 方程求得猝灭速率常数如表 3 所示。

由图 4 可以看出, 在不同温度时, 配合物 1-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, 该现象说明了配合物 1 对牛血清白蛋白的荧光猝灭过程为静态猝灭。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  $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ <sup>[23]</sup>, 而配合物 1 对 BSA 的荧光猝灭常数  $K_q$  约为  $2.47 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 远大于双分子间最大动态猝灭常数, 该结果也进一步说明配合物 1 对牛血清白蛋白的荧光猝灭过程为静态猝灭。

表 3 配合物 1-BSA 在不同温度的 Stern-Volmer 常数  
Table 3  $K_{SV}$  of complex 1 and BSA at different temperatures

$T / K$	$K_{sv} / (L \cdot mol^{-1})$	$K_q / (L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1})$	$R^2$
293	$3.09 \times 10^4$	$3.09 \times 10^{12}$	0.993
298	$2.42 \times 10^4$	$2.42 \times 10^{12}$	0.996
303	$2.21 \times 10^4$	$2.21 \times 10^{12}$	0.992
308	$2.16 \times 10^4$	$2.16 \times 10^{12}$	0.996

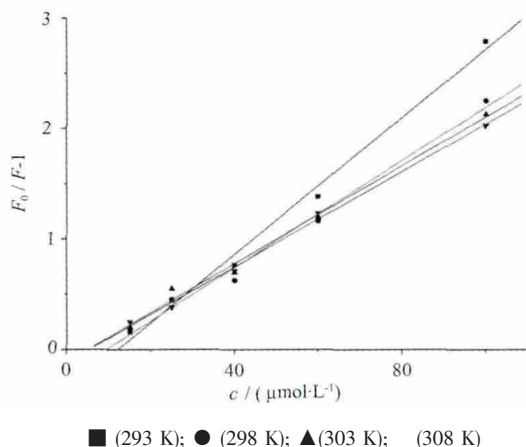


图 4 配合物 1-BSA 在不同温度时的 Stern-Volmer 曲线

Fig.4 Stern-Volmer curves of complex 1-BSA at different temperatures

### 2.5 用静态猝灭法分析配合物 1 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 BSA 的荧光强度;  $F$  为加入猝灭剂后 BSA 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<sup>[24]</sup>。在不同温度下, 将 BSA 与配合物 1 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 5)。由图 5 求出在不同温度下的配合物 1 与 BSA 的结合常数  $K$ 、相关系数  $R^2$  以及结合位点数  $n$ (表 4)。

如表 4 所示, 配合物 1 与 BSA 相互作用的结合常数  $K$  和结合位点数  $n$ (平均值为 1.28)均随着温度的升高而逐渐降低, 该结果表明一个配合物 1 分子与 BSA 分子中的一个位点进行相互作用, 它们之间的结合常数  $K$  的平均值为  $5.06 \times 10^5 L \cdot mol^{-1}$ 。而结合常数  $K$  的大小反映了配合物与 BSA 相互作用的难易程度, 对比已报道的配合物  $[Cu(phen)(5-Fu)_2](NO_3)_2$ <sup>[25]</sup>、配合物  $[Cu(phen)(L-phe)(H_2O)] \cdot ClO_4$ <sup>[26]</sup> 和配合物  $[Cu(phen)(gly)(H_2O)]ClO_4 \cdot 5H_2O$ <sup>[26]</sup> 分别与 BSA 相互作用的结合常数(分别为  $2.13 \times 10^6 L \cdot mol^{-1}$ ,  $8.33 \times 10^3 L \cdot mol^{-1}$  及  $1.05 \times 10^4 L \cdot mol^{-1}$ ), 结合这些配合物的结构特征, 初步分析

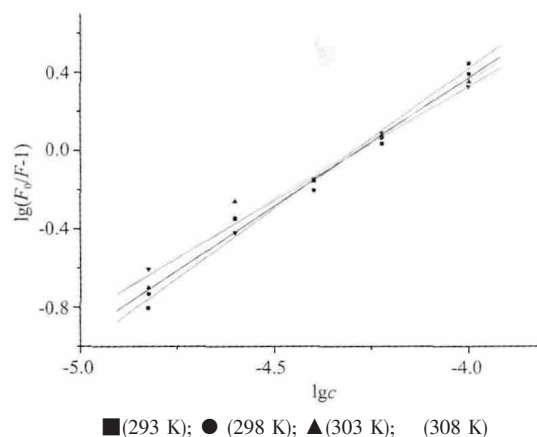


图 5  $\lg(F_0/F-1)$  与  $\lg c_Q$  的关系曲线

Fig.5 Relation curves of  $\lg(F_0/F-1)$  and  $\lg c_Q$

表 4 配合物 1 与 BSA 的结合常数  $K$ ,  $R^2$  及结合位点数  $n$   
Table 4 Binding constant,  $R^2$  and binding site of complex 1 and BSA

$T / K$	$K / (L \cdot mol^{-1})$	$R^2$	$n$	
293	$\lg(F_0/F-1)=6.13+1.43 \lg c_Q$	$1.35 \times 10^6$	0.993	1.43
298	$\lg(F_0/F-1)=5.62+1.31 \lg c_Q$	$4.17 \times 10^5$	0.989	1.31
303	$\lg(F_0/F-1)=5.19+1.21 \lg c_Q$	$1.55 \times 10^5$	0.991	1.21
308	$\lg(F_0/F-1)=5.01+1.17 \lg c_Q$	$1.02 \times 10^5$	0.987	1.17

表明:当含金属离子-邻菲咯琳的三元配合物与 BSA 相互作用时,该配合物中的有机配体的空间结构或位阻对它们的结合常数的大小有一定程度的影响。

## 2.6 配合物 1 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<sup>[27]</sup>。表 5 的  $\Delta H$ 、 $\Delta S$  以及  $\Delta G$  的计算值是分别通过以下 3 个方程计算所得(其中由于温度变化不大,体系的焓变看成是一个常数)。

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

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

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

Ross<sup>[27]</sup>与 Mohammed<sup>[28]</sup>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; $\Delta H > 0, \Delta S > 0$  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 5 数据中可以看出,配合物 1 与 BSA 间相互作用时,体系的  $\Delta H < 0, \Delta S < 0$ ,该结果支持配合物 1 与 BSA 间相互作用时的主要作用力是氢键和范德华力。

表 5 配合物 1 与 BSA 相互作用时的热力学参数的计算

Table 5 Thermodynamic parameters of complex 1 and BSA

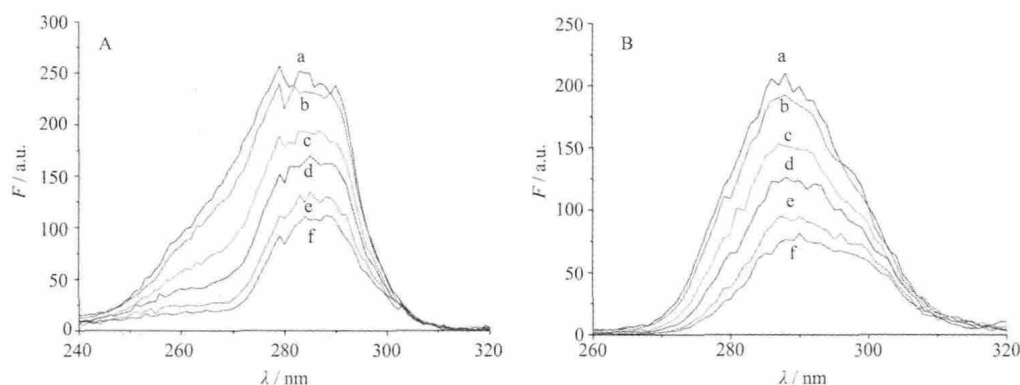
$T / K$	$K / (L \cdot mol^{-1})$	$\Delta H / (kJ \cdot mol^{-1})$	$\Delta S / (J \cdot K^{-1})$	$\Delta G / (kJ \cdot mol^{-1})$
293	$1.35 \times 10^6$	-134.6	-408	-14.93
298	$4.17 \times 10^5$	-134.6	-405	-13.92
303	$1.55 \times 10^5$	-134.6	-401	-13.07
308	$1.02 \times 10^5$	-134.6	-395	-12.83

## 2.7 配合物 1 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<sup>[29-31]</sup>。而蛋白质的荧光主要来自于色氨酸、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,探讨色氨酸或酪氨酸

的构象或周围环境是否发生改变<sup>[32]</sup>。图 6 分别为 298 K 时, $\Delta\lambda=15$  nm 与  $\Delta\lambda=60$  nm 时,配合物 1 与 BSA 相互作用时的同步荧光的测定结果。

如图 6 所示,保持 BSA 的浓度为  $1.0 \times 10^{-5} mol \cdot L^{-1}$  不变,逐渐增加配合物 1 的浓度,随着配合物浓度的增加,体系在 290 nm 附近的同步荧光光谱强度均逐渐降低;在  $\Delta\lambda=60$  nm 的同步荧光光谱中,其



A:  $\Delta\lambda=15$  nm; B:  $\Delta\lambda=60$  nm; From a to f curves  $c/(\mu mol \cdot L^{-1})$ : 0, 10, 15, 25, 40, 60, respectively

图 6 配合物 1 与 BSA 相互作用时的同步荧光光谱

Fig.6 SFS of complex 1 and BSA

最大发射波长有一定的红移,而在  $\Delta\lambda=15\text{ nm}$  的同步荧光光谱中,其最大发射波长没有明显的变化。该结果表明配合物 **1** 与 BSA 相互作用时,主要是通过改变牛血清白蛋白中色氨酸残基的构象或其周围环境,而对酪氨酸残基的构象或周围环境没有明显的影响<sup>[33-35]</sup>。结合已报道的关于  $[\text{Co}(\text{Hlact})_2(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  与 BSA 的相互作用结果<sup>[17]</sup>:即  $[\text{Co}(\text{Hlact})_2(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  配合物与 BSA 相互作用后,该配合物上的邻菲咯啉或乳酸配体被 BSA 所取代;以及上述关于配合物 **1** 与 BSA 相互作用时力的形式及作用的位点数,初步推断配合物 **1** 与 BSA 相互作用的模式为:当该配合物 **1** 与 BSA 相互作用时,配合物 **1** 上的乳酸配体部分或全部被 BSA 所取代,同时该配合物中的邻菲咯啉配体通过采用范德华力与 BSA 的作用,从而改变了 BSA 中色氨酸残基的构象或其周围环境。

### 2.8 配合物 **1** 与 BSA 相互作用时距离的计算

根据 Forster 型偶极-偶极无辐射能量转移机理<sup>[22]</sup>,转移效率  $E$  与给体-受体间距离  $r$  及临界能量转移距离  $R_0$  有关:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (1)$$

其中  $R_0$  是转移效率为 50% 时的临界距离;

$$R_0^6 = 9.79 \times 10^9 (k^2 N^{-4} \Phi_D J)^{1/6} \quad (2)$$

式中:  $R_0$  以 nm 为单位,  $k$  为偶极空间取向因子,  $n$  为介质的折射指数,  $\Phi$  为给体的荧光量子产率,  $J$  为给体 BSA 的荧光发射光谱与受体(配合物 **1**) 的吸收光谱间的光谱重叠积分,可表示为:

$$J = \int F_D(\nu) \epsilon_A \nu^{-4} \Delta\nu / \int F_D(\nu) \Delta\nu \quad (3)$$

式中,  $F(\nu)$  为荧光给体在波数  $\nu$  处的荧光强度,

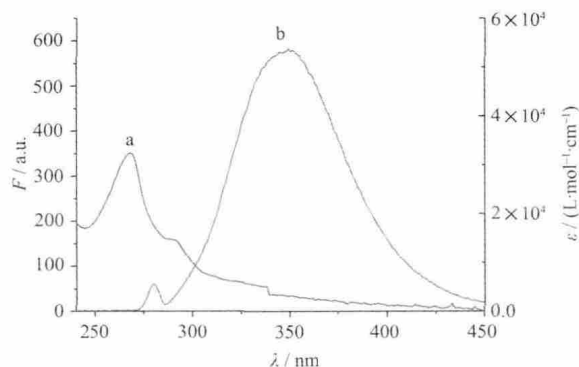


图 7 配合物 **1** 的吸收光谱(a)和 BSA 的荧光发射光谱(b)

Fig.7 (a) Absorption spectrum of complex **1** and (b) Fluorescence emission of BSA

$\epsilon(\nu)$  为受体在波数  $\nu$  处的摩尔吸收系数。能量转移效率可由下式求出:

$$E = 1 - F/F_0 \quad (4)$$

式中  $F$  和  $F_0$  分别为加入和不加猝灭剂时 BSA 的荧光强度。

因此,在 298 K 时,分别测定 BSA 的荧光发射光谱以及与 BSA 的物质的量比为 1:1 时,配合物 **1** 的吸收光谱,其光谱重叠情况如图 7 所示,把光谱重叠部分分割成极小的矩形面积求和,求出  $J=6.78 \times 10^{-16} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。同时取向因子取给体-受体各向随机分布的平均值  $K^2=2/3$ <sup>[36]</sup>,折射指数取水和有机物的平均值  $n=1.336$ <sup>[36]</sup>,BSA 中色氨酸的量子产率  $\Phi=0.15$ <sup>[37]</sup>,代入式(2),求得  $R_0=1.63\text{ nm}$ ,由式(4)算得  $E=0.10$ ,再把  $R_0$  及  $E$  的值代入(1)式,得  $r=2.35\text{ nm}$ 。

## 3 结论

本文合成和表征了邻菲咯啉乳酸镍配合物,当配合物与 BSA 相互作用时,配合物 **1** 上的乳酸配体部分或全部被 BSA 上的氨基酸配体所取代,该配合物对 BSA 的荧光猝灭为静态猝灭过程;它们两者之间主要采用范德华力或分子间氢键的作用力形式、通过改变 BSA 中色氨酸残基的构象或其周围环境进行相互作用,其结合常数的平均值为  $5.06 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,作用距离为 2.35 nm。

参考文献:

- [1] Baroni S, Mattu M, Vannini A, et al. *Eur. J. Biochem.*, **2001**, **268**:6214-6220
- [2] Choi B M, Kim Y M, Jeong Y R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2004**,**321**:132-137
- [3] LIU Xue-Feng(刘雪峰), XIA Yong-Mei(夏咏梅), FANG Yun (方云), et al. *Acta Chim. Sinica (Huaxue Xuebao)*, **2004**,**62**: 1484-1490
- [4] YANG Pin(杨频), YANG Bin-Sheng(杨斌盛). *Prog. Biochem. Biophys. (Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan)*. **1992**, **19**:110-114
- [5] Sugio S, Kashima A, Mochizuki S. *Protein Eng.*, **1999**,**12**: 439- 446
- [6] Liu Z S, Li F M, Huang Y S. *Biomed. Chromatogr.*, **1999**,**4**: 262-266
- [7] HUANG Jian-Hua(黄建华), MA Hong-Min(马洪敏), SUN Shu-Ting(孙舒婷). *Spectrosc. Spect. Anal. (Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi)*, **2006**,**26**:1899-1902
- [8] ZHOU Xing-Jun(周兴军), AO-DENG Go-Wa(敖登高娃),

- HUANG Zhen-Zhen(黄臻臻). *Chinese J. Anal. Lab. (Fenxi Shiyanshi)*, **2007**,**26**:25-28
- [9] Smith P K, Krohn R I, Hermanson G T, et al. *Anal. Biochem.*, **1985**,**150**:76-85
- [10] Krystal G, Macdonald C, Munt B, et al. *Anal. Biochem.*, **1985**,**148**:451-460
- [11] Yao G, Li K A, Tong S Y. *Talanta*, **1999**,**50**:585-594
- [12] WEI Yong-Ju(魏永巨), TONG Shen-Yang(童沈阳), LI Ke-An(李克安). *Acta Chim. Sinica (Huaxue Xuebao)*, **1995**,**53**:83-89
- [13] WEI Yong-Ju(魏永巨), LI Ke-An(李克安), TONG Shen-Yang(童沈阳). *Chem. J. Chinese Universities (Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao)*, **1996**,**17**:550-552
- [14] GOU Jing(苟劲). *J. Chongqing Instit. Technol. (Nat. Sci. Ed.)*, **2002**,**16**:62-64
- [15] HAN De-Qiang(韩德强), DING Hong-Biao(丁宏标), QIAO Yu(乔宇). *Biotechnol. Bull. (Shengwu Jishu Tongbao)*, **2005**,**5**:35-38
- [16] ZHENG Chen-Mou(郑臣谋), LUO Yu-Ji(罗裕基), HUANG Kun-Yao(黄坤耀). *Acta Sci. Nat. Univ. Sunyatseni Nat. Sci. Ed. (Zhongshan Daxue Xuebao)*, **1996**,**35**:1-4
- [17] LIN Hai-Bin(林海彬), WANG Qing-Xiang(汪庆祥), ZHOU Zhao-Hui(周朝晖). *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2011**,**27**:1239-1244
- [18] Berta C, Rosa C, Ezequiel M V L. *CrystEngComm*, **2006**,**8**:167-177
- [19] Brustein E A, Vedenkina N S, Irkova M N. *Photochem. Photobiol.*, **1973**,**18**(4):263-279
- [20] YANG Man-Man(杨曼曼), XI Xiao-Li(席小莉), YANG Pin(杨频). *Chem. J. Chinese Universities (Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao)*, **2006**,**27**:687-691
- [21] Lakowicz J R. *Principles of Fluorometric Spectroscopy*. New York: Plenum Press, **1983**:87
- [22] 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
- [23] XIE Meng-Xia(谢孟峡), XU Xiao-Yu(徐晓云), WANG Ying-Dian(王英典). *Acta Chim. Sinica (Huaxue Xuebao)*, **2005**,**63**:2055-2062
- [24] YANG Mei-Ling(杨美玲), YANG Pei-Ju(杨培菊), SONG Yu-Min(宋玉民). *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2005**,**21**:483-489
- [25] CHEN Ya(陈稚), LIU Xin-Guang(刘新光), LIN Xiao-Fang(林晓芳). *Chem. Res. (Huaxue Yanjiu)*, **2011**,**22**:25-29
- [26] HUANG Yu-Ting(黄钰婷), REN Xiang-Xiang(任祥祥), LIU Hai-Feng(刘海峰). *Chem. Res. (Huaxue Yanjiu)*, **2009**,**20**:37-40
- [27] Ross P D, Subramanian S. *Biochemistry*, **1981**,**20**:3096-3102
- [28] Mohammed H R, Toru M, Tomoko O, et al. *Biochem. Pharmacol.*, **1993**,**46**:1721-1731
- [29] CHEN Guo-Zeng(陈国珍), HUANG Xian-Zhi(黄贤智), XU Jin-Gou(许金钩). *Fluorescence Analysis. 2nd Ed. (荧光分析)*. Beijing: Science Press, **1990**:122-189
- [30] SONG Yu-Min(宋玉民), WU Jin-Xiu(吴锦绣). *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2006**,**22**:2165-2172
- [31] SONG Yu-Min(宋玉民), LIU Zhe(刘哲), WANG Kun-Jie(王坤杰). *Acta Chim. Sinica (Huaxue Xuebao)*, **2010**,**68**:2191-2198
- [32] Miller J N. *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.*, **1979**,**16**:203-208
- [33] Chou J, Qu X, Lu T, et al. *Microchem. J.*, **1995**,**52**:159-165
- [34] Rao C M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1991**,**176**:1351-1357
- [35] ZHANG Xiao-Wei(张晓威), ZHAO Feng-Lin(赵凤林), LI Ke-An(李克安). *Chem. J. Chinese Universities (Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao)*, **1999**,**20**:1063-1067
- [36] Lakowicz J R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2nd Ed.* New York: Plenum Press, **1999**:367-394
- [37] FENG Xi-Zeng(冯喜增), BAI Chun-Li(白春礼), LIN Zhang(林璋). *Chinese J. Anal. Chem. (Fenxin Huaxue)*, **1998**,**26**:154-157