

月桂酸咪唑啉两性表面活性剂与牛血清白蛋白的相互作用

黄忠林^a, 周瑜^b, 方霞^b, 刘凡^b

(乐山师范学院 a. 国资处; b. 化学学院, 四川 乐山 614004)

摘要:利用荧光光谱法研究了月桂酸咪唑啉两性表面活性剂与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用, 用 Stern - Volmer 方程、Lineweaver - Burk 方程确定了其荧光猝灭机理为静态猝灭, 得到了在不同的温度和 pH 值条件下月桂酸咪唑啉两性表面活性剂和 BSA 作用的结合点位点、结合常数和热力学参数, 研究表明其作用力主要为范德华力。

关键词:月桂酸咪唑啉; 牛血清白蛋白; 荧光光谱; 结合位点数; 结合常数

中图分类号: O657.3

文献标志码: A

血清白蛋白合成于肝脏, 是脊椎动物血浆中最丰富的蛋白质。可以与许多内源性和外源性化合物结合而作为储存和转运蛋白, 特别是血清白蛋白对药物分子不同程度地结合可以起到储存、运输等生理功能^[1]。蛋白质 - 表面活性剂复配体系不仅在药物、化妆品、生物及食品等领域中有着广泛的应用, 而且还可以用于模拟生物体系, 对加快生物技术向化工、医药等传统领域的渗透和应用具有重要的意义。牛血清白蛋白因与人血清白蛋白有着相似结构, 常被用作体外模型进行研究^[2-4]。而表面活性剂通过食物链或皮肤进入人体, 与人体中的蛋白质发生反应, 可引起蛋白质构象的变化或干扰人体对药物的吸收, 从而对人的健康造成影响^[5-10]。咪唑啉两性表面活性剂具有低毒、无刺激性、杀菌力和缓蚀力, 是良好的乳化剂, 并可在 pH3 - pH13 的较宽范围内使用, 所以有必要研究它对生理过程的影响^[8]。本文应用荧光光谱法研究月桂酸咪唑啉两性表面活性剂与牛血清白蛋白的作用机制以及溶液 pH 值、温度和表面活性剂浓度对反应体系的影响, 得到表面活性剂与 BSA 作用的结合常数、结合位点及热力学参数。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

荧光分光光度计(带恒温装置, Cary eclipse, 美国 VARIAN 公司), 实验室 pH 计(FiveEasy, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司), 分析天平(AE240, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。牛血清白蛋白(BSA, 上海伯奥生物科技有限责任公司), 月桂酸咪唑啉两性表面活性剂(由乐山师范学院有机化学研究室提供, 参阅文献 11 合成), 三羟甲基氨基甲烷(Tris), 盐酸, 氯化钠等试剂均为分析纯, 实验用水均为三次蒸馏水。

1.2 实验方法

取 1.50 mL 缓冲溶液于比色皿中, 加入 0.50 mL 浓度为 1×10^{-5} mol/L 牛血清白蛋白的氯化钠溶液, 再加入 1.00 mL 水和不同体积的月桂酸咪唑啉两性表面活性剂(加入体积 $\leq 100 \mu\text{L}$), 309 K 恒温 10 min, 在激发和发射光栅狭缝均为 5 nm, 激发波长为 285 nm 下, 扫描 300 ~ 500 nm 范围内月桂酸咪唑啉两性表面活性剂与牛血清白蛋白(BSA)作用的荧光光谱图, 并测定其荧光强度。

收稿日期: 2013-05-07

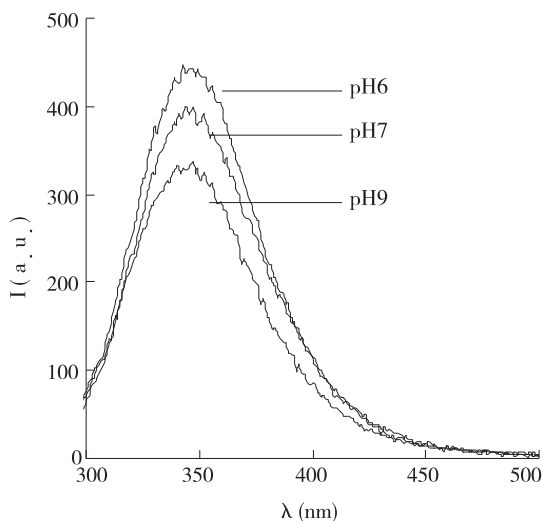
基金项目: 四川省教育厅重点科研项目(10ZA031)

作者简介: 黄忠林(1968-), 女, 四川成都人, 高级实验师, 主要从事表面化学方面的研究, (E-mail) huangzl@lsnu.edu.cn

2 结果与讨论

2.1 温度为 309 K 和 315 K 下 pH 对 BSA 的荧光猝灭的影响

按照实验方法进行操作,在未加入表面活性剂之前对体系进行扫描,得到荧光光谱图。由实验知无论温度是 309 K 还是 315 K,反应的荧光强度都随着 pH 的升高而减小(图 1),但发射峰和峰型基本不变,说明 pH 对牛血清白蛋白的立体构象产生了影响,而没有引起 BSA 的化学结构的改变。



(T = 309K, [BSA] = 1.67 × 10⁻⁶ mol/L, pH = 6.00, 7.00, 9.00)

图 1 pH 对 BSA 的荧光光谱的影响

2.2 月桂酸咪唑啉两性表面活性剂对 BSA 的荧光光谱猝灭的影响

在 BSA 的溶液中,BSA 的荧光强度随着加入月桂酸咪唑啉的浓度的增加而降低,发射峰位和峰型基本不变(图 2)。说明月桂酸咪唑啉对 BSA 发生了猝灭作用。荧光猝灭是溶液中猝灭分子和荧光物质分子之间发生的相互作用。荧光强度被猝灭的方式有:静态猝灭、动态猝灭、电荷转移猝灭以及能量转移猝灭等方式^[12]。

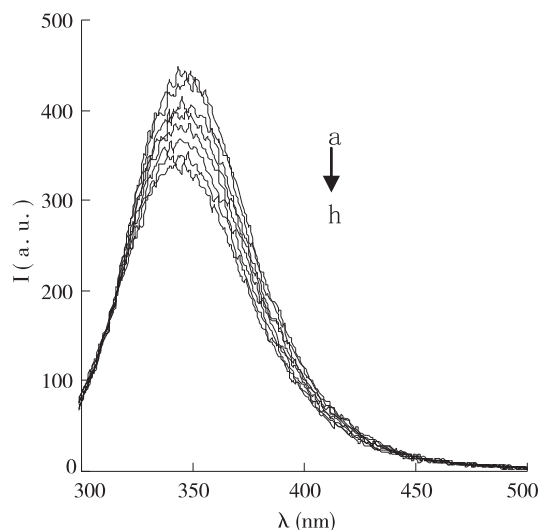
如果该体系是动态猝灭,则荧光动态猝灭应遵循 Stern - Volmer 方程^[6]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [D_t] = 1 + K_{sv} [D_t] \quad (1)$$

即

$$\frac{F_0 - F}{F} = K_{sv} [D_t] \quad (2)$$

式中, K_{sv} 是 Stern - Volmer 动态猝灭常数, K_q 是动态猝灭速率常数, τ_0 是没有猝灭剂存在情况下荧光分子的平均寿命($\tau_0 = 10^{-8}$ s); F_0 是 BSA 溶液的荧光发射总量;



([月桂酸咪唑啉] = 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 (× 10⁻⁷ mol/L) (a - h), [BSA] = 1.67 × 10⁻⁶ mol/L, pH = 7.00, T = 309K)

图 2 月桂酸咪唑啉对 BSA 的荧光光谱猝灭的影响

F 是加入月桂酸咪唑啉两性表面活性剂后的荧光发射总量, D_t 是猝灭剂月桂酸咪唑啉两性表面活性剂的浓度。根据 Stern - Volmer 方程,作出月桂酸咪唑啉两性表面活性剂浓度对 BSA 的回归方程,求出 K_q , 如表 1 所示。

表 1 不同温度和 pH 下月桂酸咪唑啉表面活性剂与 BSA 作用的猝灭速率常数

温度	pH	回归方程	R ²	$K_q/10^{10}$ (L · mol ⁻¹ · s ⁻¹)
309K	6.00	$y = 3030.5x - 0.0477$	0.9948	30.31
309K	7.00	$y = 3128.0x + 0.0114$	0.9903	31.28
309K	9.00	$y = 205.48 + 0.012$	0.9695	2.05
315K	6.00	$y = 2787.4x + 0.0183$	0.9946	27.87
315K	7.00	$y = 1967.8x + 0.002$	0.9926	19.68
315K	9.00	$y = 172.4x + 0.0174$	0.9786	1.72

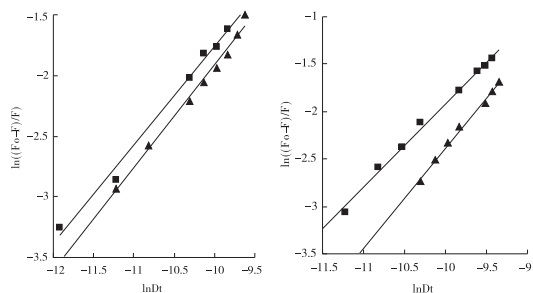
Conditions: ([BSA] = 1.67 × 10⁻⁶ mol/L, [Lauric acid imidazole] = 0, 2, 0, 4, 0, 6, 0, 8, 0, 10, 12, 14 (× 10⁻⁷ mol/L)

由表 1 可知,猝灭常数 K_q 远远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大动态猝灭速率常数 2.0×10^{10} L · mol⁻¹ · S⁻¹。且在任何 pH 下 $K_{q,309K} > K_{q,315K}$, 这表明月桂酸两性表面活性剂对 BSA 的荧光猝灭不是分子之间因碰撞而造成的动态荧光猝灭,而应该是分子间结合而引起的静态猝灭。

月桂酸咪唑啉与牛血清白蛋白的猝灭作用是静态猝灭,即应遵循静态猝灭公式 Lineweaver - Burk 方程:

$$\ln \frac{F_0 - F}{F} = \ln K_a + n \ln D_t \quad (3)$$

根据公式(3)和实验数据,分别在不同温度下作 $\ln((F_0 - F)/F)$ 对 $\ln D_t$ 的曲线(图 3)。其线性方程线性关系良好($R^2 > 0.99$),并根据线性方程的截距和斜率求出不同温度, pH 条件下的 K_a 和 n 值(表 2)。在相同的



([BSA] = 1.0 × 10⁻⁵ mol/L, [Lauric acid imidazoline] = 0, 2, 0, 4, 0, 6, 0, 8, 0, 10, 12, 14 (× 10⁻⁷ mol/L), pH = 6.00, 7.00, T = 309K (■), 315K (▲)

图3 不同 pH 下 $\ln((F_0 - F)/F)$ 对 $\ln(D_i)$ 的关系

pH 值溶液中,月桂酸咪唑啉与 BSA 的结合常数随温度的升高而减小,即溶液温度升高,分子运动速度加剧,使得月桂酸咪唑啉 - BSA 二元复合物发生离解而使其结合常数减小;在相同的温度条件下,月桂酸咪唑啉与 BSA 的结合常数随 pH 值的升高而减小,这可能是因为低 pH 值时 BSA 中的疏水性基团更容易被月桂酸咪唑啉胶束所包裹,结合而形成“珍珠项链结构”,使其二元配合物的结合常数随 pH 值增高而减小。

表2 不同温度,不同 pH 下月桂酸咪唑啉表面活性剂对 BSA 的结合常数、结合位点和热力学常数

T(K)	pH	K _a	n	-ΔG (KJ/mol)	-ΔH (KJ/mol)	-ΔS(J/mol)
309	6.00	3640.59	1.0579	21.07	178.90	510.77
315	6.00	966.32	0.8788	18.00		510.79
309	7.00	676.14	0.8433	16.74	24.57	25.34
315	7.00	563.52	0.8099	16.59		25.33
309	9.00	507.75	0.8469	16.00	20.23	13.69
315	9.00	395.44	0.8259	15.66		14.51

Conditions: [BSA] = 1.0 × 10⁻⁵ mol/L, [Lauric acid imidazoline] = 0, 2, 0, 4, 0, 6, 0, 8, 0, 10, 12, 14 (× 10⁻⁷ mol/L)

由表2可知,随着温度的升高,各组结合常数均减小,ΔG减小,ΔH < 0,ΔS < 0,所以牛血清白蛋白与月桂酸两性表面活性剂之间的相互作用力主要为氢键和范德华力。

3 结论

经研究表明,月桂酸咪唑啉两性表面活性剂对 BSA 有较强的荧光猝灭作用,其作用机理属于静态猝灭,其作用力主要是疏水作用力。同时,pH 的升高对牛血清白蛋白的荧光效应有抑制作用。

参考文献:

[1] 刘凡,周艳,徐云英.对氯苯酚与牛血清白蛋白的相互作用研究[J].化学研究与应用,2011,23(12):1610-1615.

2.3 月桂酸咪唑啉两性表面活性剂对牛血清白蛋白作用的结合位点、结合常数及热力学参数

生物大分子同有机小分子的结合,他们之间的作用力主要是弱的相互作用,主要有氢键、疏水作用力、静电引力与范德华等。Ross^[13]等根据大量的实验结果,归纳出来判断有机小分子和生物大分子之间的结合类型的方法。即当ΔH < 0,ΔS > 0时,他们之间的结合力主要为静电引力;ΔH < 0,ΔS < 0时为氢键和范德华力;ΔH > 0,ΔS > 0为疏水作用力。当温度变化不大时,反应的焓变和熵变可以看做常数,计算体系的热力学参数的公式如下:

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (4)$$

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \times \frac{\Delta H}{R} \quad (5)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (6)$$

式中,K为表观结合常数,热力学温度T₁、T₂分别对应表观结合常数K₁、K₂,ΔG为自由能变,ΔH为焓变,ΔS为熵变,K₁、K₂可由相应温度下与作用模型相关的数据处理中求得,根据公式(4)、(5)、(6)可计算出热力学参数ΔG、ΔS、ΔH。实验结果如下表2。

[2] Zhu S,Liu Y.Spectroscopic analyses on interaction of Naphazoline hydrochloride with bovine serum albumin [J].Spectrochimica acta.Part A:Molecular and biomolecular spectroscopy,2012,98A:142-147.

[3] Tao H,Lu S,Xie J.Spectroscopic analysis of the interaction between thiazolo[2,3-b]pyrimidine analogues and bovine serum albumin[J].Spectrochimica acta.Part A,Molecular and biomolecular spectroscopy,2012,96A:690-697.

[4] Duan H,Wei W,Luo S.Spectrometric investigations on the binding of dopamine to bovine serum albumin[J].Physics and Chemistry of Liquids,2012,50(3):453-464.

[5] 吴丹.研究 GEMINI 表面活性剂与蛋白质的相互作用[D].济南:山东大学,2007.

[6] 宋九华,李琼,黄忠林,等.表面活性剂吐温与牛胰蛋

- 白酶作用研究[J].皮革科学与工程,2009,19(2):22-26.
- [7] 吴丹,徐桂英.谱法研究蛋白质与表面活性剂的相互作用[J].物理化学学报,2006,22(2):254-260.
- [8] 刘磊,陈凌宇,郑星,等.荧光法研究 Gemini 表面活性剂与 BSA 的相互作用[J].胶体与聚合物,2011,29(1):31-33.
- [9] 杨朝霞,张友玉,杨琴,等.光谱法研究映节西林钠与牛血清白蛋白的作用[J].应用化学,2007,24(8):858-862.
- [10] 王春,吴秋华,王志,等.槲皮素与牛血清白蛋白相互作用的相互作用[J].光谱学与光谱分析,2006,26(9):1672-1675.
- [11] 周晓东,孙道兴,王卫.月桂酸咪唑啉两性表面活性剂的合成及应用[J].精细石油化工进展,2003,4(11):38-40.
- [12] 许金钩,王尊本.荧光分析法[M].3版.北京:科学出版社,2006.
- [13] Ross P D, Submmanian S. Thermodynamic of protein association reactions:forces contributing to stability[J]. Biochem,1981,20:3096-3102.
- [10] 王春,吴秋华,王志,等.槲皮素与牛血清白蛋白相互作用的相互作用[J].光谱学与光谱分析,2006,26(9):1672-1675.

Interaction Between the Lauric Acid Imidazoline Amphoteric Surfactant and the Bovine Serum Albumin

HUANG Zhong-lin^a, ZHOU Yu^b, FANG Xia^b, LIU Fan^b

(a. State-owned Asset Management Department; b. College of Chemistry, Leshan Normal University, Leshan 641004, China)

Abstract: The interaction between lauric acid imidazoline and bovine serum albumin (BSA) is investigated by fluorescence spectroscopy. It is proved that the fluorescence quenching mechanism belongs to the static quenching by Stern-Volmer equation and Lineweaver-Burk equation. Then the binding sites, binding constants and thermodynamics parameters of the interaction between lauric acid imidazoline and bovine serum albumin are obtained under the condition of different temperatures and pH values. The results show that Van der Waals' force plays a main role in the binding of lauric acid imidazoline and BSA.

Key words: lauric acid imidazoline; bovine serum albumin; fluorescence spectroscopy; binding sites; binding constants