

铬天青 $\text{Cu}(\text{II})$ 配合物与牛血清白蛋白作用的光谱研究*

Spectra Study on the Interaction Between the Complexes of CAS- $\text{Cu}(\text{II})$ and Bovine Serum Albumin

陶卓奇, 田红艳, 韦向玲, 梁 情, 潘灵娟, 李芳芳, 廖 森* *

TAO Zhuo-qi, TIAN Hong-yan, WEI Xiang-ling, LIANG Qing, PAN Ling-juan, LI Fang-fang, LIAO Sen

(广西大学化学化工学院, 广西南宁 530004)

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

摘要: 结合均匀设计试验方法及数据挖掘技术, 采用紫外-可见吸收光谱及共振散射光谱研究铬天青 $\text{Cu}(\text{II})$ 配合物与牛血清白蛋白的相互作用。确定试验的最佳条件为 pH 值 = 6, 0.1 mol/L 离子强度剂 (NaCl) 用量 0.5 ml, 0.1% 铬天青用量 0.6 ml 得到紫外-可见吸收光谱的吸光度随着铜离子浓度的增加而线性下降, 其对应的方程及参数为: $\Delta A = 0.08302 - 0.06207C$, $R = -0.9987$, $SD = 0.001830$ 。共振散射光谱的强度则随着铜离子浓度的增加而线性的增强, 其对应的方程及参数为: $\Delta I = -226.15 + 287.9C$, $R = 0.9866$, $SD = 17.38$ 。

关键词: 配合物, 铬天青 $\text{Cu}(\text{II})$, 牛血清白蛋白, 紫外-可见吸收光谱, 共振散射光谱, 均匀设计, 数据挖掘
中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2010)01-0068-04

Abstract The interaction between CAS- $\text{Cu}(\text{II})$ complex and bovine serum albumin (BSA) was studied with UV absorption spectroscopy and resonance scattering spectroscopy. Uniform experimental design as well as data mining technology were applied in the experiments, in which the optimal technical conditions were obtained. The experimental results of the optimal technical conditions showed that the absorbency of UV absorption spectra linearly decreased with increase of $\text{Cu}(\text{II})$ concentration. The linear equation and parameters were $\Delta A = 0.08302 - 0.06207C$, $R = -0.9987$, $SD = 0.001830$, and the intensity of resonance scattering spectra linearly increased with increase of $\text{Cu}(\text{II})$ concentration. The linear equation and parameters were $\Delta I = -226.148 + 287.9015C$, $R = 0.9866$, $SD = 17.38261$.

Key words complex, CAS- $\text{Cu}(\text{II})$, bovine serum albumin (BSA), electron spectroscopy, resonance scattering spectroscopy, uniform design, data mining

铜酶在生命体内催化氧化还原反应, 铜是生命必需微量金属元素之一。血清白蛋白是血浆中最为丰富的蛋白质, 它可以作为许多内源性和外源性化合物的存储与转运蛋白^[1]。铜离子在体内的输送和代谢与血

清白蛋白密切相关。因此 $\text{Cu}(\text{II})$ 牛血清白蛋白 (BSA) 相互作用的研究具有重要的生物学意义。

共振散射技术是一项在普通荧光分光光度计上进行测量的光散射分析技术。在普通的荧光分光光度计上选择合适的激发和发射通带宽度, 采用相等的激发和发射波长同时扫描激发和发射单色器所得的同步光谱 (即 $\Delta\lambda = 0$) 即为散射粒子的共振散射光谱^[2]。我们应用均匀设计法和试验数据挖掘技术^[3-5], 对 $\text{Cu}(\text{II})$ 铬天青配合物与牛血清白蛋白的相互作用进行紫外-可见吸收光谱及共振散射光谱研究, 获悉了该相互作用在两种光谱中铜离子浓度与光谱强度的线性变化规律, 为进一步的研究提供了基础与依据。

收稿日期: 2009-04-18

修回日期: 2009-05-18

作者简介: 廖 森 (1963-), 男, 博士, 教授, 主要从事材料化学的研究工作。

* 教育部科研重点项目 (批准号: 205120) 和广西科学基金 (批准号: 桂科基 0575006, 桂科自 0640009), 广西大学化学化工学院创新实践基金 (2007年) 资助。

* * 通讯作者。

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

试验的主要试剂有: 铬天青 (CAS), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaCl , KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 牛血清白蛋白 (BSA)均为市售分析纯。主要仪器为: 尤尼柯上海仪器有限公司 UV-2102紫外-可见分光光度计, 日本岛津 RF-530荧光分光光度计, 上海雷磁仪器厂 PHS-3C精密 pH值计。

1.2 均匀设计试验

1.2.1 实验设计

先寻找紫外-可见吸收光谱的最佳条件, 然后在此基础上进行荧光光谱试验。借鉴文献 [6-13] 的研究结果知道, 在紫外-可见吸收光谱的体系中主要的影响因素有 3 个, 他们分别是: 缓冲溶液 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 体系)^[11] 的 pH 值 (X_1); 0.1 mol L^{-1} 离子强度剂 (NaCl) 的用量 (X_2 , ml), 0.1% 铬天青的用量 (X_3 , ml) 本试验以 X_1, X_2, X_3 为水平因素 (表 1), 参考文献 [4, 5] 设计因素 10 水平的试验方案 (表 2)。

表 1 因素拟水平

Table 1 Table of factors and imitative levels

| No. | X_1 | X_2 (ml) | X_3 (ml) |
|-----|-------|------------|------------|
| 1 | 6.0 | 0.5 | 0.2 |
| 2 | 6.0 | 0.5 | 0.2 |
| 3 | 6.5 | 1.0 | 0.3 |
| 4 | 6.5 | 1.0 | 0.3 |
| 5 | 7.0 | 1.5 | 0.4 |
| 6 | 7.0 | 1.5 | 0.4 |
| 7 | 7.5 | 2.0 | 0.5 |
| 8 | 7.5 | 2.0 | 0.5 |
| 9 | 8.0 | 2.5 | 0.6 |
| 10 | 8.0 | 2.5 | 0.6 |

表 2 均匀设计试验方案

Table 2 The experimental program of uniform design

| No. | X_1 | X_2 | X_3 | $Y_1 \Delta A$ | $Y_2 \Delta A$ | $Y_3 \Delta A$ | $\bar{Y} \Delta A$ |
|-----|-------|-------|-------|----------------|----------------|----------------|--------------------|
| 1 | 6.0 | 1.5 | 0.5 | -0.00618 | -0.00628 | -0.00620 | -0.00622 |
| 2 | 6.0 | 2.5 | 0.3 | -0.01358 | -0.01360 | -0.01350 | -0.01356 |
| 3 | 6.5 | 1.0 | 0.6 | -0.04600 | -0.04592 | -0.04596 | -0.04596 |
| 4 | 6.5 | 2.5 | 0.4 | -0.00270 | -0.00273 | -0.00279 | -0.00274 |
| 5 | 7.0 | 1.0 | 0.2 | -0.00180 | -0.00200 | -0.00220 | -0.00200 |
| 6 | 7.0 | 2.0 | 0.6 | -0.04300 | -0.04312 | -0.04315 | -0.04309 |
| 7 | 7.5 | 0.5 | 0.4 | -0.00640 | -0.00647 | -0.00639 | -0.00642 |
| 8 | 7.5 | 2.0 | 0.2 | -0.00116 | -0.00116 | -0.00116 | -0.00116 |
| 9 | 8.0 | 0.5 | 0.5 | -0.00974 | -0.00972 | -0.00967 | -0.00971 |
| 10 | 8.0 | 1.5 | 0.3 | -0.01980 | -0.01979 | -0.01984 | -0.01981 |

1.2.2 实验步骤

每一次试验 10^4 g mL^{-1} 的 Cu^{2+} 及 3 mg mL^{-1} BSA 的用量均固定为 1.0 mL 室温下, 按表 2 的试验方案的

指导, 在 10 mL 的比色管中依次加 pH 值为 X_1 缓冲溶液 2 mL , 离子强度剂 $X_2 \text{ mL}$, 0.1% 显色剂 $X_3 \text{ mL}$, 10^4 g mL^{-1} 的 Cu^{2+} 溶液 1.0 mL , 3 mg mL^{-1} BSA 1.0 mL , 用二次去离子水稀释至刻度, 摇匀, 在 UV-2102 紫外-可见分光光度计上扫描 (波长为 $300 \sim 700 \text{ nm}$), 获悉含 Cu^{2+} 样和试剂空白样最大 ΔA 值的波长为 426 nm , 然后在该波长下进行测定。每一次试验点均做 3 个平行试验, 得到的 ΔA 值及其平均值记录在表中。

1.3 数据挖掘

1.3.1 回归分析建模

将表 2 的数据用计算机进行逐步回归分析处理^[5], 所得到的方程及相应的参数如下。

$$Y = -3.5770 \times 10^{-3} + 2.6013 \times 10^{-3} \times (X_2 - 1.5) + 0.11126 \times (X_3 - 0.4) - 4.0054 \times 10^{-3} \times (X_1 - 7)^2 - 0.47436 \times (X_3 - 0.4)^2 - 5.4656 \times (X_3 - 0.4)^3 \quad (1)$$

方程的常数项 $BO = -3.5770 \times 10^{-3}$, 统计量 $F = 223.87$, 相关系数 $R = 0.99822$, 标准偏差 $S = 1.4805 \times 10^{-3}$, F 临界值 $FO = 1.54$, 方程变量项的 F 统计量为: $F_1 = 12.35, F_2 = 100.4, F_3 = 8.63, F_4 = 193.6, F_5 = 327.1$ 经过 F 检验可知, 方程变量项的第 3 项通过 $T = 0.025$ 的 F 显著性检验, 第 1 2 4 5 项及总方程均通过了 $T = 0.01$ 的 F 显著性检验

1.3.2 静态数据挖掘

用网格法^[5]对回归方程进行最优化计算, 所得的最优化工艺参数为: $X_1 = 6, X_2 = 0.5 \text{ mL}, X_3 = 0.6 \text{ mL}, Y = -0.05063$

1.3.3 动态数据挖掘

优化计算所得的最佳参数是一组静态的数值, 为了得到更为丰富的信息, 还需要分析回归方程中各因素对试验指标的动态影响

为了直观起见, 以最优点为基准, 方程 (1) 可以变换得到如下反应各因素对指标单独影响的方程

$$Y = -0.046626 - 4.0054 \times 10^{-3} \times (X_1 - 7)^2, \quad (2)$$

$$Y = -0.048030 + 2.6012 \times 10^{-3} \times (X_2 - 1.5), \quad (3)$$

$$Y = -0.010184 + 0.11126 \times (X_3 - 0.4) - 0.47436 \times (X_3 - 0.4)^2 - 5.4656 \times (X_3 - 0.4)^3 \quad (4)$$

用方程 (2) ~ (4) 作 $X-Y$ 图得图 1 的 3 条曲线由图 1 的第 1 条曲线可见, X_1 对 Y 的影响为一条对称的开口向上的抛物线, 为了获得较大的 $|Y|$ 值, X_1 应尽量取试验范围的最小值或者最大值, 从实际考虑以最小值为好。由图 1 的第 2 条曲线可见, X_2 对 $|Y|$ 的

影响为一条随 X_2 增大而下降的直线,为了获得较大的 $|Y|$ 值, X_1 应尽量取试验范围的最小值。图 1 的第 3 条曲线为 X_3 对 Y 的影响的曲线,是一条马鞍形三次曲线,左边为开口下抛物线,右边为开口向上的抛物线,曲线的最高点在右边,为了获得最大的 $|Y|$ 值, X_3 应取最大值。图 1 的结果与静态数据挖掘的结果相吻合。

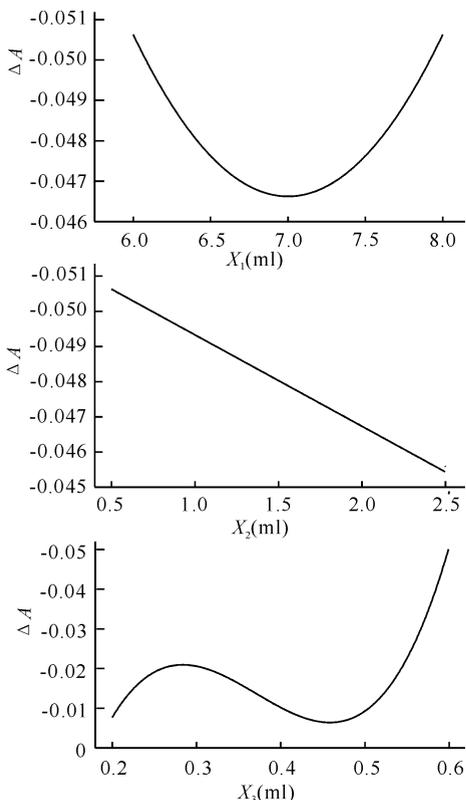


图 1 X_1, X_2, X_3 对 Y 的影响
Fig. 1 Effect of X_1, X_2, X_3 on Y

1.4 验证试验

1.4.1 最优工艺验证

静态数据挖掘得到的最佳参数: $X_1 = 6, X_2 = 0.5\text{ml}, X_3 = 0.6\text{ml}$,在 UV-2102 紫外-可见分光光度计上进行紫外-可见吸收光谱的测定,所得产物的透光率 $Y_1 = -0.052252, Y_2 = -0.051325, Y_3 = -0.050338, \tilde{Y} = -0.051305$ 接近理论预报值。实际试验最优值与理论最优值相互符合。

1.4.2 铜离子浓度与紫外-可见吸收光谱 ΔA 关系

配制一系列不同浓度的 Cu^{2+} 标准溶液,用静态数据挖掘得到的最佳参数: $X_1 = 6, X_2 = 0.5\text{ml}, X_3 = 0.6\text{ml}$,在 UV-2102 紫外-可见分光光度计上进行紫外-可见吸收光谱的测定,所得的结果(图 2)显示, Cu^{2+} 浓度 C 在 $0.8 \sim 2.4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 范围内, ΔA 和 C 之间呈良好的线性关系。线性方程和相关参数分别为: $\Delta A = 0.08302 - 0.06207C, R = -0.99873, SD = 0.00183$

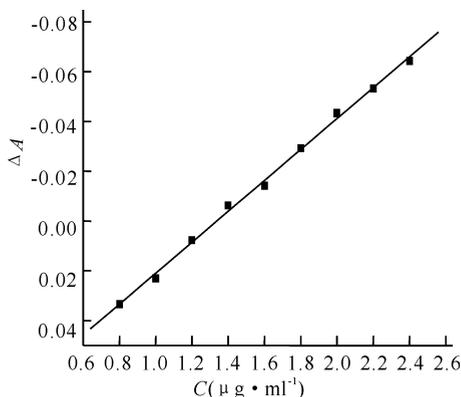


图 2 铜离子浓度与 ΔA 的关系

Fig. 2 The relation between Cu^{2+} concentrations and ΔA

1.4.3 铜离子浓度与共振散射光谱强度关系

配制一系列不同浓度的 Cu^{2+} 标准溶液,用静态数据挖掘得到的最佳参数: $X_1 = 6, X_2 = 0.5\text{ml}, X_3 = 0.6\text{ml}$,在 RF-530 荧光分光光度计上用同步扫描的方法进行共振散射光谱的测定。测定的波长为 $296 \sim 700\text{nm}$, $\lambda_{ex} = \lambda_{em}$, 激发波长为 296nm ,灵敏度低,扫描速度快,激光分光器狭缝为 3nm 。由图 4 获得的含 Cu^{2+} 试样和试剂空白样最大 ΔI (图 4) 获悉, Cu^{2+} 浓度 C 在 $0.8 \sim 1.6 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 范围内, ΔI 和 C 之间呈良好的线性关系。线性方程和相关参数分别为: $\Delta I = -226.148 + 287.9015C, R = 0.9866, SD = 17.38261$

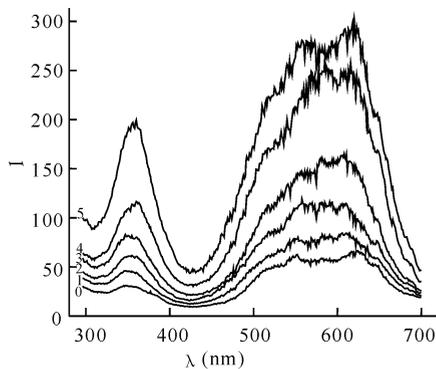


图 3 $\text{Cu}(\text{II})$ CAS 配合物 BSA 作用的共振散射光谱

Fig. 3 The resonance scattering spectra of interaction between $\text{Cu}(\text{II})$ CAS complex and BSA

0 CK; 1-5 Cu^{2+} 试样编号 Cu^{2+} Sample number.

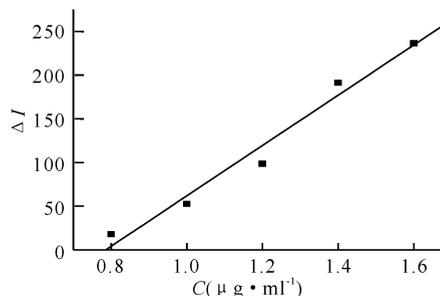


图 4 铜离子浓度与 ΔI 的关系

Fig. 4 The relation between Cu^{2+} concentrations and ΔI

2 结果与分析

2.1 紫外-可见吸收光谱

由图 5 可见, 尽管 10 个试验的条件不同, 然而这 20 个谱图只是强度有所区别, 图谱的峰形没有改变, 最大吸收峰的位置没有移动, 也没有新的吸收峰出现。再结合图 2 显示的, Cu^{2+} 浓度越大, ΔA 越小的结果, BSA 可能主要是以静电作用的形与铬天青 $\text{Cu}(\text{II})$ 配合物发生相互作用。

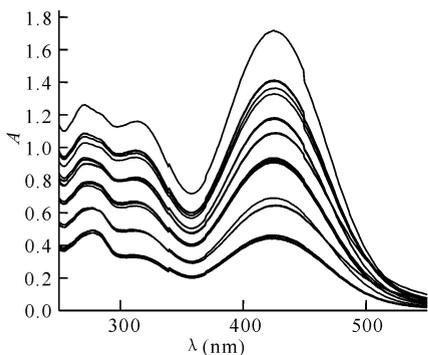


图 5 $\text{Cu}(\text{II})$ CAS 配合物与 BSA 作用的紫外-可见光谱

Fig. 5 The electron spectra of interaction between $\text{Cu}(\text{II})$ CAS complex and BSA

2.2 共振散射光谱

金属配合物和 BSA 作用一般会导致荧光淬灭的出现^[6-13]。但是, 本试验图 4 结果显示, 随着 Cu^{2+} 浓度的增加, 不但没有出现荧光淬灭的现象, 反而出现了荧光增强的现象。这说明 $\text{Cu}(\text{II})$ CAS 配合物与 BSA 之间通过静电缔合作用, 形成了有荧光的缔合物^[12], 进而引起荧光强度增加。根据这个实验结果可以建立简便迅速、灵敏度高的白蛋白测定方法, 用于血清和尿样中人血清白蛋白的含量测定。

3 结论

我们结合均匀试验设计及数据挖掘技术, 采用紫外-可见吸收光谱法和荧光光谱法研究铬天青 $\text{Cu}(\text{II})$ 配合物与牛血清白蛋白的相互作用, 确定了最佳度验条件为 pH 值 6, 0.1 mol/L 离子强度剂 (NaCl) 的用量 0.5 ml, 0.1% 铬天青的用量 0.6 ml, 得到吸光度与铜离子浓度呈负线性关系, 其对应的方程及参数为 $A = 0.08302 - 0.06207C$, $R = -0.9987$, $SD = 0.001830$; 荧光强度与铜离子浓度呈正线性关系, 其对应的方程及参数为 $I = 226.15 + 287.9C$, $R =$

0.986 , $SD = 17.38$ 根据 $\text{Cu}(\text{II})$ CAS 配合物与 BSA 之间相互作用引起荧光强度增加这一实验结果, 可以建立简便迅速、灵敏度高的白蛋白测定方法, 用于血清和尿样中人血清白蛋白的含量测定。

参考文献:

- [1] 秦身钧, 申金山, 李艳廷, 等. 金属离子与血清白蛋白结合反应研究进展 [J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 2003, 27(1): 75-80.
- [2] 魏永巨, 康志敏, 戚秀菊, 等. 铝试剂的共振散射光谱研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2003, 23(1): 115-118.
- [3] 吴洪特, 宋宝玲, 孙雅博, 等. 低热固相合成碱式碳酸钠铝纳米晶及其数据挖掘 [J]. 化工学报, 2006, 57(5): 1232-1237.
- [4] 吴洪特, 廖森, 吴文伟, 等. 低热固相合成磷酸镧及其结晶度的研究 [J]. 化工学报, 2007, 58(11): 2943-2947.
- [5] 廖森. 试验设计及数据挖掘技术 [M]. 北京: 中国文化教育出版社, 2006: 17-99.
- [6] 张利, 刘斌, 杨斌盛. 3-羟基-2-萘甲酸-铬(III)配合物与牛血清白蛋白作用的光谱研究 [J]. 光谱实验室, 2007, 24(2): 188-190.
- [7] 陈奎治, 彭亦如, 林伟, 等. 光谱分析法研究八羧酸酞菁铝配合物与牛血清白蛋白的结合作用 [J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(1): 84-87.
- [8] 杨美玲, 杨培菊, 宋玉民. 芦丁金属配合物的合成、表征及与血清白蛋白的相互作用 [J]. 无机化学学报, 2005, 21(4): 483-489.
- [9] 林伟, 彭亦如, 陈奎治, 等. 光谱分析法研究四磺酸酞菁金属配合物与牛血清白蛋白的结合作用 [J]. 分析化学, 2006, 34(3): 411-414.
- [10] 曾芳, 杨昌英, 潘家荣, 等. 稀土杂多配合物 $\text{K}_{15}[\text{Ce}(\text{BW}_{11}\text{O}_{39})_2] \cdot 17\text{H}_2\text{O}$ 与 BSA 的相互作用 [J]. 稀土, 2006, 27(4): 5-9, 20.
- [11] 王君, 任百祥. Gd(III) 氨基多羧酸配合物与蛋白质相互作用的紫外光谱研究 [J]. 吉林师范大学学报: 自然科学版, 2004(2): 59-61.
- [12] 楼书聪, 杨玉玲. 化学试剂手册 [M]. 第 6 版. 南京: 江苏科学技术出版社, 2003: 1288.
- [13] 何华, 叶海英, 戴丽, 等. 洛美沙星- Tb^{3+} 配合物与 BSA 相互作用的荧光光谱研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(3): 480-483.

(责任编辑: 邓大玉)