

Mn(II)与EHPG结合的光谱研究

李海鹏, 赵春贵*, 李晓莉, 杨斌盛

山西大学化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006

摘要 在 pH 7.4, 0.05 mol · L⁻¹ N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(Hepes)及室温条件下, 用荧光光谱和紫外吸收差光谱进行了 Mn(II)与 N, N'-乙炔二[2-(2-羟基苯基)甘氨酸](EHPG)相互作用的研究。结果表明, Mn(II)对 EHPG 荧光的猝灭为静态猝灭, Mn(II)与 EHPG 形成 1:1 的配合物, 条件解离常数 K_D 为 1.43 × 10⁻⁵。紫外吸收差光谱表明, 随着 Mn(II)的不断滴加其紫外差光谱在 238 和 291 nm 处吸收峰逐渐增强。经计算配合物的 ε_{238 nm} 为 (1.31 ± 0.02) × 10⁴ cm⁻¹ · mol⁻¹ · L, 条件解离常数 K_D 为 (1.36 ± 0.21) × 10⁻⁵。与荧光光谱结果一致且均表明 Mn(II)与 EHPG 结合比较弱。

关键词 EHPG; Mn(II); 荧光光谱; 紫外吸收差光谱

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2007)02-0313-04

引言

锰是人体所需的重要微量元素之一, 在体内作为某些代谢酶的组成部分或酶的激活剂参与体内许多生理生化反应。其在体内通常以 Mn²⁺, Mn³⁺ 和 Mn⁴⁺ 三种状态存在, 其中尤以 Mn²⁺ 较为普遍^[1]。正常情况下机体内锰处于相对平衡状态, 如果缺锰会引发脂肪肝及肝细胞纤维化等病症; 如果锰含量过高会导致帕金森等中枢神经系统病症^[1-3]。研究表明, 锰在体内的转运过程中转铁蛋白起到了重要的作用^[4]。EHPG(结构如图 1)因其配位基团类似于脱铁转铁蛋白与金属离子结合的配位基团而作为用于金属离子与脱铁转铁蛋白结合研究的模拟化合物, 目前已经测定了近 20 种金属离子与 EHPG 的作用及条件稳定常数^[5-8]。但是 Mn(II)与 EHPG 结合及其条件稳定常数等的研究未见系统报道。本文以荧光光谱、紫外吸收差光谱的方法研究了 Mn(II)与 EHPG 的相互作用。

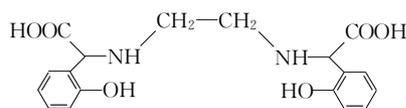


Fig. 1 Structure of EHPG

1 仪器和试剂

HITACHI F-2500 荧光光谱仪, Eppendorf 微量加样器,

HITACHI U-2010 UV-Vis 光谱仪, Inolab 酸度计。试剂 N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(Hepes), N, N'-乙炔二[2-(2-羟基苯基)甘氨酸](EHPG)及 MnSO₄ · 5H₂O 均为分析纯。

2 实验方法

2.2 EHPG 和 Mn(II) 储备液

EHPG 储备液: 称取适量的 EHPG, 加入适量的去离子水, 稍微加热直至 EHPG 完全溶解, 并经过络合滴定法确定其浓度为 6.86 × 10⁻⁴ mol · L⁻¹, 4 °C 备用。滴定中 Zn(II) 为滴定剂, 二甲酚橙为指示剂, 在 pH 5.6 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液中进行。

Mn(II) 储备液: 用水溶解在 400 °C 灼烧至恒重的无水 MnSO₄, 制备成 9.52 × 10⁻³ mol · L⁻¹ 的溶液。

2.3 光谱检测

2.3.1 荧光光谱检测

荧光光谱在 290~400 nm 范围内使用 HITACHI F-2500 荧光光谱仪测定, 滴定在室温条件下使用 1 cm 荧光池。固定激发波长 280 nm, 激发狭缝为 5 nm, 发射狭缝为 10 nm, 滴定中反应时间间隔为 2 min。数据处理中对滴定的稀释效应进行校正。此外, 在其他条件相同的情况下, 分别又在 25 和 37 °C 进行了 Mn(II)与 EHPG 作用的荧光光谱检测。

2.3.2 紫外差光谱检测

紫外差光谱在 230~400 nm 范围内使用 HITACHI U-2010 紫外光谱仪测定, 光谱滴定在室温条件下使用 1 cm 两

收稿日期: 2005-12-16, 修订日期: 2006-05-28

基金项目: 山西省自然科学基金项目(20031017)资助

作者简介: 李海鹏, 1982 年生, 山西大学体育学院运动生理专业硕士研究生

* 通讯联系人

e-mail: chungui@sxu.edu.cn

室差光谱吸收池。滴定中反应时间间隔为 2 min, 数据处理中将吸光度转化为以 EHPG 的分析浓度表示的表观摩尔吸光系数($\Delta\epsilon_{\text{obs}}$)。

实验中所有的玻璃仪器及荧光池、吸收池均使用 1 mol · L⁻¹ HNO₃ 浸泡, 蒸馏水冲洗。

3 结果和讨论

3.1 荧光光谱

3.1.1 Mn(II) 与 EHPG 作用的荧光光谱

在 pH 7.4, 0.05 mol · L⁻¹ HEPes 及室温条件下, 将 2 mL 浓度为 4.05 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹ 的 EHPG 加入 1 cm 荧光池中, 测定其荧光发射光谱如图 2 中曲线 1。由图可见, 由于 EHPG 芳香环的 $\pi^* \rightarrow \pi$ 跃迁, EHPG 在 310 nm 处有最大荧光峰。逐渐滴加 Mn(II) 溶液时, 其在 310 nm 处的荧光强度逐渐降低, 当 Mn(II) 达到一定量时, 荧光强度不再发生变化。

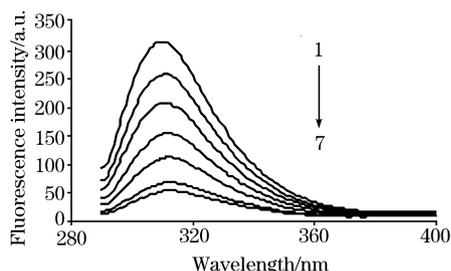


Fig. 2 The fluorescence spectra for the addition of Mn(II) to EHPG with λ_{ex} 280 nm. The volume (μL) of Mn(II) (9.52×10^{-3} mol · L⁻¹) from 1 to 7 is 0; 1.5; 3.5; 6; 10; 25; 35

3.1.2 温度对荧光强度的影响

在其他条件不变的情况下, 测定 25 和 37 °C 时的荧光光谱, 按照 Stern-Volmer 动态猝灭方程式: $F_0/F = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{\text{SV}}[Q]$, 以 310 nm 处的初始荧光强度与每一滴定点的相对荧光强度的比值(F_0/F)对 $[\text{Mn}]$ 作图 (见图 3), 经线性拟合得到 25 和 37 °C 的方程分别为: $F_0/F = 0.4768[\text{Mn}] + 1.0161$ ($r^2 = 0.9974$) 和 $F_0/F = 0.3774[\text{Mn}] + 0.9718$ ($r^2 = 0.9872$)。由图 3 可以看出, 曲线有良好的线性关系, 并且随着温度的升高, EHPG 的猝灭曲线的斜率降低, 从这里可以认为猝灭非动态猝灭, 初步表明 Mn(II) 对 EHPG 的荧光猝灭为静态猝灭^[9, 10]。

3.1.3 Mn(II) 与 EHPG 络合比的测定

将 310 nm 处的相对荧光强度(F_{au})对 Mn(II) 与 EHPG 的摩尔比 ($n = c_{\text{Mn}}^+ / c_{\text{EHPG}}$) 作图, 由图 4 可见, 随着 Mn(II) 的滴加, 相对荧光强度在 $n < 1$ 之前成线性地减小; 当 $n > 1$ 后, 相对荧光强度随 n 的增加而减小的程度逐渐降低, 当 $n \geq 4$ 时基本不再变化, 表明 Mn(II) 与 EHPG 形成 1 : 1 的配合物。Mn(II) 对 EHPG 的荧光猝灭是由于酚羟基质子解离并与 Mn(II) 配合引起的。

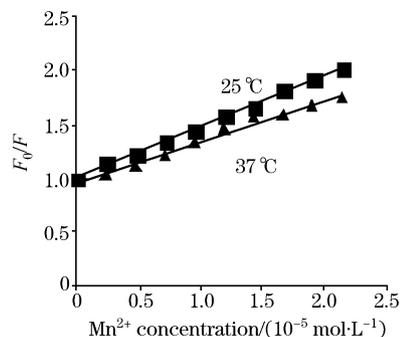


Fig. 3 The effect of temperature on the binding of Mn(II) to EHPG

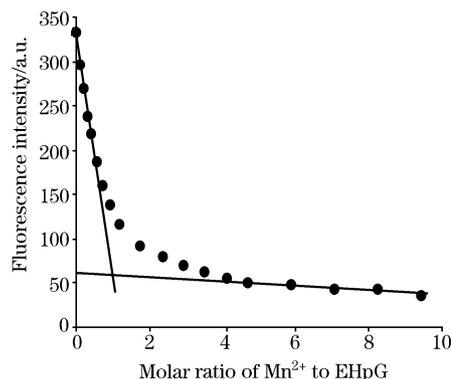


Fig. 4 Titration curves of Mn(II) to EHPG at 310 nm

3.1.4 结合常数的计算

按照静态猝灭理论, 以 310 nm 处的相对荧光强度, 用公式(1)~(3)求出每一滴定点的 $[\text{Mn}]_f$, 根据(4)式将 F_0/F 对 $[\text{Mn}]_f$ 作图, 经线性拟合斜率即为 Mn(II) 与 EHPG 的结合常数 K_A (如图 5)。拟合方程为: $F_0/F = 0.6979[\text{Mn}]_f + 1.0315$ ($r^2 = 0.9863$), 可得 K_A 为 6.98×10^4 , 则其条件解离常数 K_D 为 1.43×10^{-5} 。

$$[\text{EHPG}]_f = \frac{F - F_\infty}{F_0 - F_\infty} [\text{EHPG}]_i \quad (1)$$

$$[\text{Mn} - \text{EHPG}] = [\text{EHPG}]_i [\text{EHPG}]_f \quad (2)$$

$$[\text{Mn}]_f = [\text{Mn}]_i [\text{Mn} - \text{EHPG}] \quad (3)$$

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_A [\text{Mn}]_f \quad (4)$$

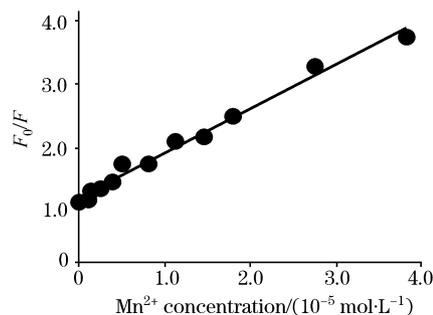


Fig. 5 The curve of the quenching of EHPG by Mn(II)

其中 $[\text{Mn-EHPG}]$, $[\text{EHPG}]_t$, $[\text{EHPG}]_f$ 分别为 Mn-EHPG 配合物浓度, EHPG 的总浓度及 EHPG 的游离浓度; $[\text{Mn}]_t$, $[\text{Mn}]_f$ 分别为 Mn(II) 的总浓度及游离浓度; F , F_0 , F_∞ 分别为每一滴定点的相对荧光强度、初始相对荧光强度、最终滴定后荧光强度不再变化时的相对荧光强度。

3.2 紫外差光谱

3.2.1 Mn(II) 与 EHPG 作用的紫外差光谱

在干燥的两室吸收池中的一侧加入 1 mL 浓度为 $8.10 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EHPG, 另一侧加入 1 mL $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPes 缓冲液后, 用 Mn(II) 溶液滴定, 分别滴加在参照和测定吸收池的缓冲液一侧, 参照吸收池的两室不混合, 而测定吸收池颠倒混匀, 其 EHPG 浓度为 $4.05 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 进行光谱扫描, 其紫外差光谱如图 6 所示。可见在 238 和 291 nm 出现 2 个最大吸收峰。随着 Mn(II) 的滴加, 238 和 291 nm 的吸光度逐渐增加。当加入的 Mn^{2+} 浓度达到一定量时, 238 和 291 nm 的吸光度不再增大。将 238 nm 的表观摩尔吸光系数 ($\Delta\epsilon_{\text{obs}}$) 对 Mn(II) 与 EHPG 的摩尔比作图。

由图 7 可见, 随着 Mn(II) 的滴加, 表观摩尔吸光度在 $n < 1$ 之前成线性地增加, 当 $n > 1$ 后, 表观摩尔吸光度随 n 的增加而增加的程度逐渐降低, 当 $n \geq 4$ 时基本不再增加, 表明 EHPG 和 Mn(II) 形成稳定的 1:1 配合物。由图 7 可得 EHPG 和 Mn(II) 形成配合物的摩尔吸光系数 ϵ 。经 3 次重复 ϵ 为 $(1.31 \pm 0.02) \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。

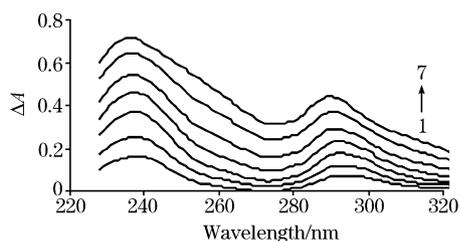


Fig. 6 UV difference spectra for Mn(II) binding to EHPG at pH 7.4 and room temperature. The volume (μL) of Mn(II) ($9.52 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) from 1 to 7 is 2; 4; 8; 14; 22; 35; 90

3.2.2 摩尔比法计算 Mn-EHPG 的解离常数

用摩尔比法, 以 238 nm 处的紫外吸收值, 按照以下公

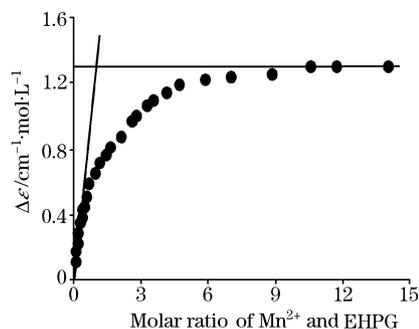


Fig. 7 Titration curve for the addition of Mn(II) to EHPG at 238 nm

式(5)~(9)来计算 Mn-EHPG 配合物的解离常数 K_D 。

$$[\text{Mn-EHPG}] = (A/A_{\text{max}})[\text{Mn}]_t \quad (5)$$

$$[\text{Mn-EHPG}] = (A/A_{\text{max}})[\text{EHPG}]_t \quad (6)$$

$$[\text{Mn}]_f = [\text{Mn}]_t - [\text{Mn-EHPG}] \quad (7)$$

$$[\text{EHPG}]_f = [\text{EHPG}]_t - [\text{Mn-EHPG}] \quad (8)$$

$$K_D = \frac{[\text{Mn}]_f [\text{EHPG}]_f}{[\text{Mn-EHPG}]} \quad (9)$$

其中 $[\text{Mn-EHPG}]$, $[\text{EHPG}]_t$, $[\text{EHPG}]_f$ 分别为 Mn-EHPG 配合物浓度, EHPG 的总浓度及 EHPG 的游离浓度; $[\text{Mn}]_t$, $[\text{Mn}]_f$ 分别为 Mn(II) 的总浓度及游离浓度; A , A_{max} 分别为每一滴定点的摩尔吸光度及达到最大值时的摩尔吸光度值。计算可得 $\epsilon = (1.31 \pm 0.02) \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$, K_D 为 $(1.36 \pm 0.21) \times 10^{-5}$ 。

综上所述, 在 pH 7.4, $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPes 及室温条件下, 荧光光谱法研究表明, Mn(II) 对 EHPG 荧光的猝灭为静态猝灭, Mn(II) 与 EHPG 形成 1:1 的配合物, 其条件解离常数 K_D 为 1.43×10^{-5} 。紫外吸收差光谱法研究表明, Mn(II) 与 EHPG 形成 1:1 的配合物, 摩尔吸光系数 $\epsilon_{238 \text{ nm}} = (1.31 \pm 0.02) \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$; Mn(II)-EHPG 的解离常数 K_D 为 $(1.36 \pm 0.21) \times 10^{-5}$, 荧光光谱及紫外吸收差光谱的研究结果较一致。表明 Mn(II) 与 EHPG 结合比较弱, 这与 Harris. W R 等用电子顺磁共振光谱(EPR)方法计算的 Mn(II) 与脱铁转铁蛋白作用的结果一致。在 Mn(II) 进入机体的过程中, 虽然两者的结合较弱, 转铁蛋白仍然发挥了一定的作用。

参 考 文 献

- [1] Jerome A Roth, Michael D Garrick. *Biochemical Pharmacology*, 2003, 66: 1.
- [2] Atsushi Takeda. *Brain Research Reviews*, 2003, 41: 79.
- [3] Vettori M V, Gatti R, Orlandini G, et al. *Toxicology in Vitro*, 1999, 13: 931.
- [4] Lu Ling, Zhang Long-lian, Li G Jan, et al. *Neuro Toxicology*, 2005, 26: 257.
- [5] Lin W, Welsh W J, Harris W R. *Inorg. Chem.*, 1994, 33: 884.
- [6] Pecoraro V L, Harris W R, Carrano C J, et al. *Biochemistry*, 1981, 20: 7033.
- [7] LI Ying-qi, BAI Hai-jing, YANG Bin-sheng(李英奇, 白海静, 杨斌盛). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2002, 22(3): 433.
- [8] WANG Jin-ling, YANG Bin-sheng(王金铃, 杨斌盛). *Chinese Journal of Inorganic Chemistry(无机化学学报)*, 2002, 18(6): 577.
- [9] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). *Methods of Fluorecence Analysis Second Edition(荧光分析法·第2版)*. Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990.
- [10] LIU Jia-qin, TIAN Jian-niao, BIAN Qing-quan, et al(刘家琴, 田建袅, 边清泉, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2006, 26(4): 715.
- [11] Harris W R, Chen Y. J. *Inorg. Biochem.*, 1994, 54(1): 1.

Spectroscopic Study on the Binding of Mn(II) to EHPG

LI Hai-peng, ZHAO Chun-gui*, LI Xiao-li, YANG Bin-sheng

Key Lab of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract Under the conditions of $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes buffer at room temperature and pH 7.4, the interaction of ethylene-N, N'-bis(o-hydroxyphenylglycine) (EHPG) and Mn(II) was investigated by both fluorescence and UV difference spectra. Results showed that the molar ratio of the complex is 1 : 1. With the addition of manganese ions, the fluorescence peak of EHPG at 310 nm decreased, while the peaks of UV absorptivity at 238 and 291 nm increased. The molar absorptivity of Mn(II) to EHPG at 238 nm is $(1.31 \pm 0.02) \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$. The disassociation constant for Mn-EHPG was determined to be $(1.36 \pm 0.21) \times 10^{-5}$. It can be concluded that the binding of Mn(II) to EHPG is not a strongly binding reaction.

Keywords EHPG; Mn(II); Fluorescence spectra; UV difference spectra

(Received Dec. 16, 2005; accepted May 28, 2006)

* Corresponding author