

山奈素与蛋白质相互作用的电化学行为研究

林丽清, 林新华*, 陈敬华, 黄丽英, 刘银环, 李光文

(福建医科大学药物分析系, 福建 福州 350004)

摘要: 应用循环伏安法研究山奈素在活化玻碳电极上的电化学行为及其与人血清白蛋白(HSA)的相互作用, 建立差示脉冲伏安法测定HSA的新方法。在pH 4.5的磷酸盐缓冲液(PBS)中, 山奈素可与HSA形成超分子复合物, 导致前者在0.468 V处的氧化电流峰下降, 其下降值与HSA浓度在0.05~0.25 mg/L范围呈线性关系, 检出限为0.008 mg/L, 可应用于血清样品测定。

关键词: 山奈素; 蛋白质; 伏安法

中图分类号: O657.1

文献标识码: A

蛋白质定量测定在临床医学和生命科学的研究中起着重要作用, 其分析方法有基于染料-蛋白质相结合的光谱分析, 荧光分析和共振光散射法^[1-2]等。电化学方法具有更高的灵敏度和选择性, 是探讨蛋白质的亚层结构和生理作用的重要手段^[3]。山奈素(3,5,7-三羟基-2-(4-羟基苯基)苯并吡喃-4-酮, kaempferide)具有抗菌、止咳、治疗支气管炎和心脑血管疾病等功能, 主要应用于抗癌、节育、抗癫痫、抗炎抗免疫等^[4-5]。其具有的电化学活性, 可与蛋白质复合, 预计可用于建立测定蛋白质的新方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

电化学测试使用CHI660B电化学分析仪(上海辰华), 由工作电极(玻碳电极)、对电极(铂丝电极)、参比电极(Ag-AgCl电极)组成三电极体系; 4.0×10^{-4} mol/L 山奈素(中国药品生物制品检定所)标准溶液; 人血清白蛋白(human serum albumin, HSA, 美国Sigma) 4℃保存, 用时稀释; 高纯N₂(99.99%); 试剂均为分析纯; 实验用水为石英亚沸二次蒸馏水。

1.2 实验

将玻碳电极依次用金相砂纸和氧化铝(0.05 μm)抛光, 蒸馏水超声清洗, 于0.5 mol/L NaOH溶液中, -0.8~1.8 V电位范围, 以100 mV/s扫速

循环扫描(10圈), 活化电极清洗后, 又于pH 4.5 PBS缓冲溶液中循环扫描至稳定。尔后, 将该电极于0.1 mol/L PBS支持电解质、50 μL山奈素与HSA溶液中通高纯N₂除氧, 测定循环伏安曲线。

2 结果与讨论

2.1 山奈素的电化学行为

图1是玻碳电极活化前(b)、后(a)山奈素的循环伏安曲线。从图可见, 山奈素在玻碳电极未活化有一对弱氧化还原峰, 电极活化后的氧化还原峰电流明显增大, 这可能活化后增大电极表面积和微孔体积^[6]。

测试表明: 扫速增加, 山奈素氧化/还原峰电流均明显增加, 在20~200 mV/s扫速范围内峰电流 I_p 与扫速呈良好的线性关系, $r = 0.9957$, 山奈素反应是吸附控制电极过程^[7]。当扫速高于100 mV/s时 E_{pa} 正移, E_{pc} 负移。其 $E_p \sim \lg \nu$ 关系如图2所示。在溶液pH 4.5, 扫速100~600 mV/s范围内 E_p 与 $\lg \nu$ 呈线性关系, $E_{pa}(\text{mV}) = 0.0258 \lg \nu + 0.4146$, $r = 0.9935$; $E_{pc}(\text{mV}) = -0.0454 \lg \nu + 0.5592$, $r = 0.9948$ 。据Laviron理论^[8]:

$$E_{pa} = A + (2.303 RT / (1 - \alpha) nF) \lg \nu \quad (1)$$

$$E_{pc} = B - (2.303 RT / \alpha nF) \lg \nu \quad (2)$$

式中A、B为常数, α 为电子转移系数, n 为电子转移数, $R = 8.314 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$, $F = 96493 \text{ C/mol}$,

收稿日期: 2009-10-16, 修订日期: 2009-12-22 * 通讯作者, Tel: (86-591) 22862016, E-mail: xinhua63@163.com

国家自然科学基金项目(20675015) 国家863计划(No. 2006AA02Z4Z1) 福建省科技厅重点项目(No. 2006 I0016) 资助

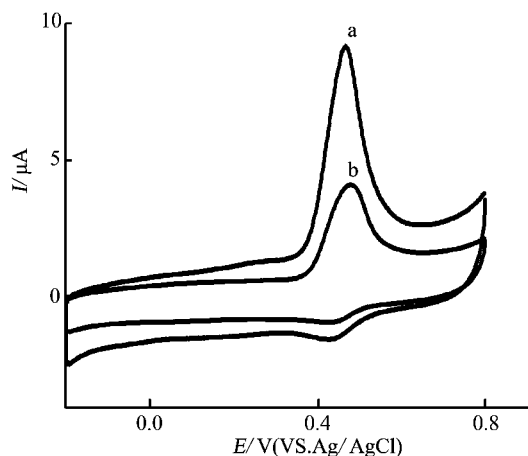


图 1 山奈素溶液 (2.0×10^{-6} mol/L) 在玻碳电极活化前 (b)、后 (a) 的循环伏安曲线

Fig. 1 Cyclic voltammograms of 2.0×10^{-6} mol/L kaempferide in 4.5 pH PBS at activated GCE (a) and non-activated GCE (b)

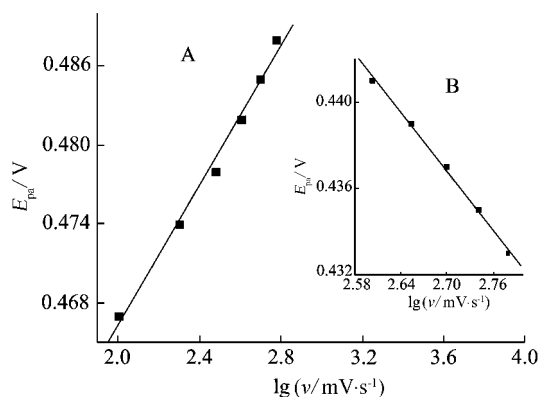
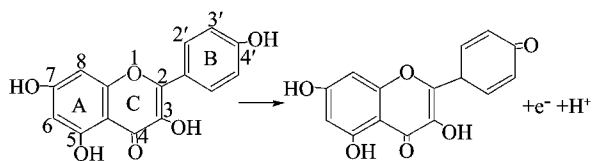


图 2 扫速对活化玻碳电极上山奈素氧化峰电位 (A) 与还原峰电位 (B) 的影响

Fig. 2 Effects of the scan rate (v) on the oxidative peak electric potential (E_{pa}) (A) and the reduction peak electric potential (E_{pc}) (B) for 2.0×10^{-6} mol/L kaempferide at the activated GCE

$T = 298$ K, 求得电子转移系数 $\alpha = 0.36$, $n = 1$. 据山奈素半峰宽 (42 mV), 同样算得 $n = 1$.

在给定扫速 100 mV/s, 山奈素的氧化还原峰电位随溶液 pH 值增加而负移. 以氧化/还原平均峰电位 E^0 (式量电位) 对 pH 作图, 在 pH 3.0 ~ 7.0 范围内呈良好的线性关系, 其线性回归方程: $E^0 = -61.3 \text{ pH} + 652.1$ ($R = 0.9978$). 据斜率 $61.3 = 59 m/n$ [7], 知 $m/n \approx 1$. 表明在 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 4.5) 中, 山奈素电化学反应是一个单电子单质子的准可逆过程, 设想其反应机理可能为:



2.2 HSA 伏安的行为

图 3 示出, 体系加入 HAS 前 (a)、后 (b, c) 活化玻碳电极上山奈素循环伏安曲线. 如图, 加入量越多, 电流峰下降越大, 这说明山奈素可与 HSA 复合, 形成的产物不具有电化学活性, 致使游离的山奈素浓度下降, 氧化峰电流下降.

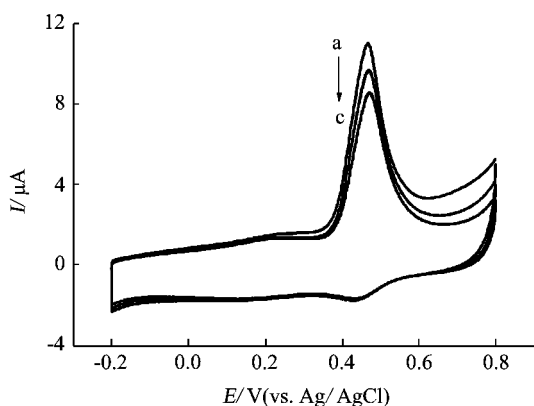


图 3 山奈素在血清白蛋白加入前 (a) 后 (b, c) 的循环伏安曲线

Fig. 3 Cyclic voltammograms of 2.0×10^{-6} mol/L kaempferol in the absence (a) and presence of HAS (b, 0.05 mg/L, c, 0.10 mg/L)

2.3 实验条件优化

应用 DPV 法可提高实验灵敏度和选择性, 以下测试均以此测定蛋白质含量.

1) 缓冲介质和酸度

比较不同缓冲液 PBS、NaAc-Hac、B-R 和六次甲基四胺对山奈素体系 Δip 的影响, 结果表明, 在 PBS 缓冲液中峰形稳定, HSA 引入后氧化峰下降明显, 且在 pH 4.0 ~ 5.0 范围内电流峰差值 Δip 最大, 故样品分析选取 pH 4.5 的 PBS 缓冲液.

2) 山奈素用量

在给定 0.10 mg/L HSA 浓度、pH 4.5 的 PBS 缓冲液中, 于山奈素浓度 $2.0 \times 10^{-6} \sim 2.0 \times 10^{-5}$ mol/L 范围内, DPV 电流峰稳定, 差值 Δip 最大. 若山奈素量过高, 则对低浓度蛋白质检测不敏感, 本文选择山奈素浓度为 2.0×10^{-6} mol/L.

2.4 干扰物

按照以上选择的 2.0×10^{-6} mol/L 山奈素溶液,要求 DPV 氧化峰电流相对误差 $\pm 5\%$,对人体内常见的金属离子、阴离子、氨基酸作干扰测定,共存物允许浓度($\mu\text{mol/L}$) 分别为: 酪氨酸(50)、柠檬酸(50)、苹果酸(50)、丝氨酸(50)、谷氨酸(50)、 Fe^{2+} (200)、 Zn^{2+} (200)、 Ca^{2+} (200) .

2.5 稳定性和精密度

稳定性要求反应 20 min 后电流峰基本稳定,且需持续 2 h 以上. 本实验选择反应时间为 20 min. 在 0. 10 mg/L HSA 溶液平行测定 6 次,电流峰相对标准偏差为 3. 01% .

2.6 线性关系和检出限

图4给出在上述优化条件下,蛋白质溶液 0. 05 ~0. 25 mg/L 范围内 Δi_p 与 C_{HSA} 呈线性关系. 山奈素 DPV 氧化峰电位不变,而电流峰降低,回归方程 $\Delta i_p = 0. 0229C + 0. 5515$, $r = 0. 9941$,检出限为 0. 008 mg/L.

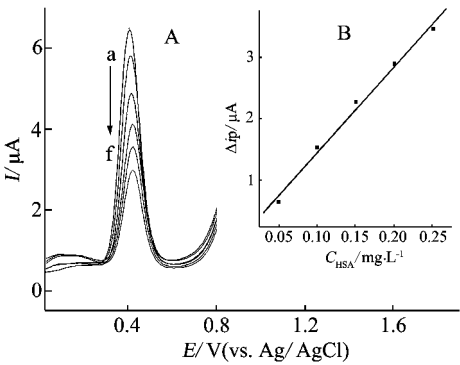


图 4 2.0×10^{-6} mol/L 山奈素随溶液中 HSA 浓度不同的差示脉冲伏安曲线(A)及 $C_{\text{HSA}} \sim \Delta i_p$ 曲线(B)

Fig. 4 Differential pulse voltammograms of 2.0×10^{-6} mol/L kaempferide for different concentrations of HSA in pH 4. 5 PBS(A) and relationship curves of concentration of HSA $\sim \Delta i_p$ (B)

C_{HSA} (a ~ f) /mg \cdot L $^{-1}$: 0 0. 05 0. 1 0. 15 0. 20 , 0. 25

2.7 样品测定

取 100 μL 人血清样品(福建医科大学附属协和医院提供) 放在 10 mL 容量瓶中,用去离子水定容至刻度,于冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 中保存. 取人血清样品稀释液 3 μL 置于 10 mL 容量瓶中定容,摇匀,作试样溶液,按上述方法测定,结果列于表 1.

表 1 HSA 样品回收率($n = 6$)

Tab. 1 Recovery of HSA real samples ($n = 6$)

Concentration of protein/ mg \cdot L $^{-1}$	Added/ mg \cdot L $^{-1}$	Found/ mg \cdot L $^{-1}$	Recovery / %
0. 21	0. 10	0. 312	102
0. 21	0. 15	0. 354	96
0. 21	0. 20	0. 416	103

3 结 论

在 pH 4. 5 的磷酸盐缓冲液中,山奈素反应是单电子、单质子的准可逆过程. 加入蛋白质后,山奈素与蛋白质相互作用形成超分子复合物,使山奈素氧化峰电流下降,电流峰下降值与 HSA 的浓度在 0. 05 ~0. 25 mg/L 范围呈线性关系,检出下限为 0. 008 mg/L ,可应用于血清样品测定.

参考文献(References) :

[1] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem , 1976 ,72(1/2) : 248-251.

[2] Wei Y J ,Li K A ,Tong S Y. The interaction of bromo-phenol blue with proteins in acidic solution [J]. Talanta ,1996 ,43(1) : 1-10.

[3] Sun W ,Jiao K. Linear sweep voltammetric determination of protein based on its interaction with alizarin red S [J]. Talanta 2002 ,56(6) : 1073-1080.

[4] Li W ,Du B N ,Wang T Y ,et al. Kaempferol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells via the ataxia-telangiectasia mutated-p53 pathway with the involvement of p53 Upregulated modulator of apoptosis [J]. Chemico-Biological Interactions ,2009 ,177(2) : 121-127.

[5] Wang J J ,Fang F ,Huang Z Y ,et al. Kaempferol is an estrogen-related receptor α and γ inverse agonist [J]. Febs Letters 2009 ,583(4) : 643-647.

[6] Tandon P K ,Dhusia M ,Sahgal S. Oxidation of cyclic ketones by alkaline hexacyanoferrate(III) catalyzed by rhodium (III) [J]. J Molecular Catalysis A: Chemical , 2009 ,301(1/2) : 146-151.

[7] Lin L Q(林丽清) ,Chen J H(陈敬华) ,Wan H Y(万红艳) ,et al. Electrochemical behavior and determination of β , β -dimethyl-acry-lalkannin [J]. Electrochemistry(电化学) 2007 ,13(2) : 220-223.

- [8] Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems [J]. *J Electroanal Chem*, 1979, 101 (1): 19-28.
- [9] Babu M S S, Reddy K H, Krishna P G. Synthesis, characterization, DNA interaction and cleavage activity of new mixed ligand copper (II) complexes with heterocyclic bases [J]. *Polyhedron*, 2007, 26(3): 572-580.

Electrochemical Behavior of Kaempferide Interaction with Protein

LIN Li-qing, LIN Xin-hua*, CHEN Jing-hua, HUANG Li-ying, LIU Yin-huan, LI Guang-wen
(*Department of Pharmaceutical Analysis, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China*)

Abstract: The electrochemical behavior of kaempferide at activated GCE and the interaction of kaempferide with human serum albumin (HSA) were investigated by cyclic voltammetry. A differential pulse voltammetric method has been proposed for the determination of the HSA with kaempferide. In pH 4.5 phosphate buffer solutions (PBS) kaempferide can react with HSA to form an electrochemically non-active supermolecular complex at activated GCE, resulting in the decrease of oxidation peak (at 0.468 V) without the change of peak potential. The decrease of the peak current is proportional to HSA concentration in the range of 0.05 ~ 0.25 mg/L. The limit of the detection is 0.008 mg/L. This method can be applied to the determination of HSA sample.

Key words: kaempferide; protein; voltammetry

重要更正

本刊 2010 年第 16 卷第 1 期封底由于排版、校对疏忽,在“中国化学会《电化学》编审委员会”名单中,漏编排编委张鉴清先生.特此更正,并向张鉴清先生表示歉意.

《电化学》编辑部