多组分丝素蛋白-Cu(II)配合物的 EPR 谱解析

胡炳文 赵学舟 宗小红 周 平*

(复旦大学高分子科学系, 聚合物分子工程教育部重点实验室, 上海 200433)

摘要 基于二阶微扰理论建立了对具有超精细耦合结构的多组分复杂 EPR(顺磁共振)谱的解析拟合方法, 并以丝素蛋白-Cu(II)配合物的 EPR 谱为例进行解析分析, 从而有效地解释了 Cu(II)离子在蚕吐丝过程中的作用. 该方法和应用程序能为类似问题的解决(如Fe(II)、Mn(II)、V(III)及其它顺磁性离子配合物 EPR 谱的解析)提供方便.

关键词: 顺磁共振(EPR), 解析, 配合物, Cu(II), 丝素蛋白

中图分类号: O641

EPR Spectral Simulation for Silk Fibroin-Cu(II) Complexes with Multiple Components

HU, Bing-Wen ZHAO, Xue-Zhou ZONG, Xiao-Hong ZHOU, Ping*

(The Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers of Ministry of Education, Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200433, P. R. China)

Abstract The simulation for electronic paramagnetic resonance (EPR) spectrum with hyperfine couplings as well as multiple coordination components is often difficult. Here we develop a simulation approach based on the second-order perturbation theory to address these issues. The EPR spectral simulations of the silk fibroin-Cu(II) complexes are taken as examples to illustrate this approach, efficiently revealing the function of Cu(II) in the spinning process of silkworm. In addition, this approach would be useful for the EPR simulations of complexes containing Fe(II), Mn(II), V(III) and other paramagnetic ions.

Keywords: Electronic paramagnetic resonance, Simulation, Complex, Cu(II), Silk fibroin

电子顺磁共振(electronic paramagnetic resonance, EPR)是直接检测含有未成对电子的顺磁性物质的现代分析方法, 在物理、化学、生物等许多领域内得到越来越广泛的应用^[1-2], 成为研究物质结构的有效手段之一.

二价 Cu(II)在 3d 轨道上有一个未成对电子(3d⁹), 对不同的配位形式有灵敏的电子顺磁共振响应信号^[2]. 研究发现, Cu(II)离子与许多物质的络合存在多种配位形式, 因此出现多组分的复杂 Cu(II)-EPR 谱, 如在蚕的吐丝过程中, Cu(II)离子与丝素蛋白(silk fibroin, SF)随 pH 的变化而形成不同配位形

式的配合物, 从而导致丝素蛋白的构象从 Silk I(以螺旋结构为主)转变为 Silk II(以 β -折叠结构为主)^[3-5]. 而对于具有超精细耦合结构的多组分复杂 EPR 谱的解析鲜有报道. 因此本工作基于二阶微扰理论建立了对该复杂体系的 EPR 谱的解析方法, 并以丝素蛋白-Cu(II)配合物的 EPR 谱为例进行解析分析, 获得了不同配合物的结构信息, 从而有效地解释了 Cu(II)离子在蚕吐丝过程中的作用.

1 实验部分

1.1 试样制备

Received: August 2, 2005; Revised: September 26, 2005. *Correspondent, E-mail: pingzhou@fudan.edu.cn; Tel: 021-55664038.

国家自然科学基金(20274009, 10475017)资助项目

本工作采用文献[5]介绍的方法,用 Cu(II)浓度为 1.8 mg Cu/g SF, 丝素蛋白浓度为 1%(w)的溶液,在 pH 分别为 8.0、6.9、5.2、4.0 条件下制得一系列的丝素蛋白-Cu(II)配合物膜(简称 SF-Cu(II)膜)。

1.2 EPR 测量

采用 Bruker 公司 EP 200D-SRC 顺磁共振谱仪。所有测试在 $T=100\text{ K}$, 微波频率 $\nu=9.67\text{ GHz}$, 扫场宽度 $W=0.12\text{ T}$ 的条件下进行。反映分子内部结构特征的 g 因子的测定,以外标化合物 DPPH(diphenyl picryl hydrazyl) 的 g 因子($g=2.0034$)为参比。

2 多组分 Cu(II)-EPR 谱的解析理论

2.1 单组分线形

对于某一具有轴对称性的物质,如许多 Cu(II)的配合物具有四面体或平面四边形结构,当其电磁子与外磁场成 θ 角时, g 因子张量可表示为^[6-7]

$$g^2 = g_{\parallel}^2 \cos^2 \theta + g_{\perp}^2 \sin^2 \theta \quad (1)$$

其中 $g_{\parallel}$ 和 $g_{\perp}$ 分别指平行于和垂直于晶轴方向的 g 因子分量。

理论上,当考虑轨道运动和电子自旋的相互作用以及核自旋和电子自旋的超精细耦合相互作用时,利用二阶微扰理论^[6-7]计算得到电子自旋的共振磁场强度为

$$H_r = \frac{h\nu}{g\beta} - \frac{K}{\beta g} \times M_I - \frac{A_{\parallel}^2 A_{\perp}^2 + K^2 A_{\perp}^2}{K^2} \times \frac{1}{4H_0 g^2 \beta^2} \times [I(I+1) - M_I^2] - \left[\frac{g_{\parallel} g_{\perp} (A_{\perp}^2 - A_{\parallel}^2)}{K g^2} \right]^2 \times \frac{1}{2H_0 g^2 \beta^2} \times \sin^2 \theta \cos^2 \theta \times M_I^2 \quad (2)$$

其中 h 是 Plank 常数, β 是波尔磁子, ν 是外加磁场的中心频率; A 是反映核自旋与电子自旋相互作用的超精细耦合张量, $A_{\parallel}$ 和 $A_{\perp}$ 分别指平行和垂直于晶轴方向的 A 分量; M_I 为核的自旋量子数,对于 Cu(II), $M_I = -3/2, -1/2, 1/2, 3/2$; I 为核的总自旋量子数,对于 Cu(II), $I = 3/2$; H_0 为产生塞曼分裂的电子自旋共振强度:

$$H_0 = \frac{h\nu}{(g_{\parallel} + 2g_{\perp})/3\beta} \quad (3)$$

并定义 K 满足:

$$K^2 g^2 = A_{\parallel}^2 g_{\parallel}^2 \cos^2 \theta + A_{\perp}^2 g_{\perp}^2 \sin^2 \theta \quad (4)$$

当外磁场强度 H 等于电子自旋的共振磁场强度 H_r 时,则产生 EPR 信号,出现共振谱线。由于任意一条在角度 θ 时的谱线都具有有限宽度,考虑到

粉末样品其谱线增宽效应满足高斯分布,则对于每一个角度 θ , 它的微分吸收线形为:

$$y(\theta) = -\frac{H - H_r}{w^3} \times \exp\left\{-\frac{(H - H_r)^2}{2w^2}\right\} \times P \times \sin \theta \times \Delta \theta \quad (5)$$

其中 w 是峰的半高宽,且

$$P = \frac{g_{\perp}^4 \sin^2 \theta + g_{\parallel}^2 g_{\perp}^2 \cos^2 \theta + g_{\perp}^2 g_{\parallel}^2}{2g^3} \quad (6)$$

当 θ 从 0 到 360° 范围内变化时,可求得谱线的总微分吸收线形为:

$$y = \sum_{\theta=0}^{360^\circ} y(\theta) \quad (7)$$

对于单一组分的线性拟合,如果假设一组初始参数 $g_{\parallel}, g_{\perp}, A_{\parallel}$ 和 $A_{\perp}$, 则可根据式(7)计算图谱的线形,并与实验谱(一般为微分谱)相比较。在不断调节参数后,可获得与实验谱相似的线形,从而最终解析出所需的参数。

2.2 多组分线形

当离子存在多组分时,则存在多组参数 $g_{\parallel(1)}, g_{\perp(1)}, A_{\parallel(1)}, A_{\perp(1)}; g_{\parallel(2)}, g_{\perp(2)}, A_{\parallel(2)}, A_{\perp(2)}; \dots; g_{\parallel(n)}, g_{\perp(n)}, A_{\parallel(n)}, A_{\perp(n)}$ 及其各组分的比例 $a_{(i)}$ 。对于每一组参数, $g_{\parallel(i)}, g_{\perp(i)}, A_{\parallel(i)}, A_{\perp(i)}$ 和 $a_{(i)}$, 可以求得对应的线形 $y_{(i)}$, 然后将它们的线形根据公式(8)相加:

$$Y = \sum_i a_{(i)} y_{(i)} \quad (8)$$

如果根据(8)式获得的多组分理论线形与实验谱相吻合,则有效地解析了复杂 EPR 谱,并确定了重要的各组分参数 $g_{\parallel(i)}, g_{\perp(i)}, A_{\parallel(i)}, A_{\perp(i)}$ 和 $a_{(i)}$ 。

3 结果与讨论

实践中,将从实验谱估测到的参数 $g_{\parallel}, g_{\perp}, A_{\parallel}$ 和 $A_{\perp}$ 作为初始值,用二阶微扰理论计算 EPR 谱,并与实验谱比较。如果计算谱与实验谱吻合不理想,则调节上述参数或调节离子配位组分的数目及比例,直至计算谱与实验谱在峰位和峰形上基本一致。一般而言,在单一组分的情况下,直接利用实验谱估测的 $g_{\parallel}, g_{\perp}, A_{\parallel}$ 和 $A_{\perp}$ 值所计算的 EPR 谱与实验谱基本吻合。但在多配位体系,即存在多组分的条件下,这一简单方法常常误差较大。较为精确的多组分参数值则是在反复调节参数并反复计算、比较得到的。

下面以 SF-Cu(II)配合物膜的 Cu(II)-EPR 谱为例阐述上述方法解析拟合 EPR 谱的过程。

首先假设 SF-Cu(II)体系只有一种配位形式,以实验谱估测的参数为初值,并进一步调节参数得到

图 1 实验 EPR 谱(上曲线)与单组分拟合 EPR 谱(下曲线)比较

Fig.1 Comparison between experimental (upper curves) and single component simulated (lower curves) EPR spectra for SF-Cu(II) complex membranes prepared at different pH values

pH:(a) 8.0, (b) 6.9, (c) 5.2, (d) 4.0

计算的 EPR 谱. 图 1 为拟合谱与实验谱的比较, 解析参数见表 1. 由图 1 可以看出, 在 $\text{pH} \geq 6.9$ 时制得 SF-Cu(II)配合物膜的图谱(图 1(a、b)), 其计算谱和实验谱的峰形和峰位吻合较好, 说明此体系中 Cu(II)为单一配位形式的假设是合理的. 而在 $\text{pH} < 6$ 时制得膜的图谱(图 1(c、d)), 虽经反复调节参数, 计算谱与实验谱的线形差异仍然较大, 如 $\text{pH}=4.0$ 对应的谱图(图 1d)在计算谱上 0.29 T 和 0.31 T 处出现的明

显凸现的峰在实验谱图上并不明显. 这说明, 酸性体系中 Cu(II)可能存在多种配位形式的叠加, 使 0.28 T 到 0.30 T 之间的实验谱出现平坦的峰形.

因此, 我们对 $\text{pH}=4.0$ 体系的谱图进行了双组分的拟合, 结果见表 2 及图 2. 可以看出, SF-Cu(II)体系的双组分假设能较好地揭示实验谱的内容. 新增组分(component 2')使得 0.28 T 到 0.30 T 之间出现了比较平坦的线形, 并且使得计算谱和实验谱的线

表 1 不同 pH 条件成膜的 SF-Cu(II)配合物 EPR 谱单组分拟合参数

Table 1 Summary of single component simulated EPR parameters for the SF-Cu(II) complexes prepared at different pH values

pH	^a $A_{\parallel}$		^a $A_{\perp}$		^b $g_{\parallel}$	^b $g_{\perp}$	$g_{\parallel} / A_{\parallel}$ (cm)
	$A_{\parallel} / \text{T}$	$10^4 A_{\parallel} / \text{cm}^{-1}$	$A_{\perp} / \text{T}$	$10^4 A_{\perp} / \text{cm}^{-1}$			
8.0	0.0197	202	0.0018	17	2.200	2.063	109
6.9	0.0182	190	0.0016	15	2.235	2.068	117
5.2	0.0165	159	0.0012	12	2.290	2.063	144
4.0	0.0158	171	0.0010	10	2.320	2.063	134

^a $A(\text{cm}^{-1})=0.46686 \times g \times A(\text{T})$, and the absolute error in all reported A values is less than $\pm 2 \times 10^{-4}$ T. ^bAbsolute error in g -values is ± 0.002 .

表 2 pH=4.0 时成膜的 SF-Cu(II)配合物 EPR 谱双组分拟合参数

Table 2 Summary of double component simulated EPR parameters for the SF-Cu(II) complex prepared at pH=4.0

pH	Component	^a $A_{\parallel}$		^a $A_{\perp}$		^b $g_{\parallel}$	^b $g_{\perp}$	$g_{\parallel} / A_{\parallel}$ (cm)	Relevant contents(%) ^c
		$A_{\parallel} / \text{T}$	$10^4 A_{\parallel} / \text{cm}^{-1}$	$A_{\perp} / \text{T}$	$10^4 A_{\perp} / \text{cm}^{-1}$				
4.0	1'	0.0160	168	0.0020	20	2.256	2.094	134	50
	2'	0.0164	177	0.0020	20	2.317	2.094	131	50

^{a,b}the same as Table 1, ^c Relevant error in all reported contents is less than 2%.

图2 pH=4.0 时成膜的 SF-Cu(II)配合物的实验 EPR 谱(上曲线)与双组分拟合的 EPR 谱(下曲线)比较

Fig.2 Comparison between experimental (upper bold line) and double component simulated (lower bold line) EPR spectra for SF-Cu(II) complex membrane prepared at pH 4.0

Thin lines in simulated spectra are deconvoluted component traces.

图3 pH=5.2 时成膜的 SF-Cu(II)配合物的实验 EPR 谱(上曲线)与三组分拟合的 EPR 谱(下曲线)比较

Fig.3 Comparison between experimental (upper bold line) and three component simulated (lower bold line) EPR spectra for SF-Cu(II) complex membrane prepared at pH 5.2

Thin lines in the simulated spectra are deconvoluted component traces.

形基本相似. 在拟合过程中由于所涉及到的参数较多, 而且彼此相互制约, 因此实践中发现, 该方法对各参数的拟合误差较小. $A_{||}$ 、 $A_{\perp}$ 的误差小于 $\pm 2 \times 10^{-4}$ T, $g_{||}$ 、 $g_{\perp}$ 的误差小于 ± 0.002 , 组分比例 a 的误差小于 $\pm 2\%$. 因此, 利用二阶微扰理论可以精确有效地解析复杂组分的 EPR 谱. 同理, 我们对 pH=5.2 体系的谱图进行了精细拟合, 发现该体系为三组分配合物组成, 结果见图 3 和表 3.

在顺磁共振波谱的研究中, g 因子和超精细耦合常数(A)是最重要的波谱参数, 因为它们反映顺磁粒子所处局部磁场的性质, 提供有关分子结构的信息. 低场区获得的参数 $g_{||}$ 和 $A_{||}$ 对 Cu(II)配合物周围环境的变化非常敏感, 通常可以用来研究 Cu(II)的不同配位类型^[8-11]. 研究发现, 当 $g_{||} / A_{||}$ 比值在 105~135 cm 之间, 表明 Cu(II)的配位形式为平面四配位结构^[8-11]. 根据林青松^[8]和 Peisach-Blumberg^[9]对大量 Cu(II)络合体系的 EPR 谱的规律总结, 我们认为, 当 pH=8.0 时, $g_{||}=2.200$ 和 $A_{||}=202 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ 对应的配位类型为 Cu~4N(Cu 与 4 个 N 原子配位); pH=6.9 时,

$g_{||}=2.235$ 和 $A_{||}=190 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ 对应的配位类型为 Cu~3N1O(Cu 与 3 个 N 原子和 1 个氧原子配位); pH=5.2 时, 有三种配位类型, 分别是 component 1 (40%, $g_{||}=2.250$, $A_{||}=168 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$), component 2 (30%, $g_{||}=2.327$, $A_{||}=172 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) 和 component 3 (30%, $g_{||}=2.290$, $A_{||}=173 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$), 它们分别对应的配位类型为 Cu~2N2O, Cu~1N3O 与 Cu~1N3O; 当 pH=4.0 时, 有两种配位类型, component 1' (50%, $g_{||}=2.256$, $A_{||}=168 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) 及 component 2' (50%, $g_{||}=2.317$, $A_{||}=177 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$), 它们分别对应的配位类型为 Cu~2N2O 和 Cu~1N3O. 值得注意的是, pH=5.2 时 component 1 和 component 2 分别与 pH 4.0 时的 component 1' 和 component 2' 相对应, 且随着 pH 的降低, component 3 逐渐转化为其他两种构象. 研究表明, Cu~4N 及 Cu~3N1O 的配位形式有利于 Silk I (以螺旋构象为主)结构的形成, 而 Cu~2N2O 和 Cu~1N3O 的配位形式有利于 Silk II (以 β -折叠构象为主)结构的形成^[5]. 这些拟合结果有效地解释了为什么蚕在吐丝过程中伴随着其腺体的 pH 值逐渐降低, 且

表 3 pH=5.2 时成膜的 SF-Cu(II)配合物 EPR 谱三组分拟合参数

Table 3 Summary of three component simulated EPR parameters for the SF-Cu(II) complex prepared at pH=5.2

pH	Component	^a $A_{ }$		^a $A_{\perp}$		^b $g_{ }$	^b $g_{\perp}$	$g_{ } / A_{ }$ (cm)	Relevant contents(%) ^c
		$A_{ } / \text{T}$	$10^4 A_{ } / \text{cm}^{-1}$	$A_{\perp} / \text{T}$	$10^4 A_{\perp} / \text{cm}^{-1}$				
5.2	1	0.0160	168	0.0010	10	2.250	2.063	134	40
	2	0.0158	172	0.0010	10	2.327	2.063	135	30
	3	0.0162	173	0.0010	10	2.290	2.063	132	30

^{a,b,c} the same as Table 2

丝素蛋白结构从 Silk I 向 Silk II 的转变. 因此, 本文基于二阶微扰理论所建立的多组分 Cu(II)-EPR 谱拟合方法是合理可信的.

4 结 论

本工作基于二阶微扰理论建立了对具有超精细结构及多组分存在的复杂 EPR 谱的解析拟合方法, 可以获得反映各个组分分子结构信息的重要参数 $g_{\parallel}$ 和 $A_{\parallel}$ 以及组分的相对含量, 进而揭示各个配合物组分的配位结构信息. 该方法对于具有一定轴对称性、核自旋不为零、多组分配位的电子自旋体系具有普遍的适用性, 如对 Cu(II)、Fe(II)、Mn(II) 和 V(III) 等配合物的 EPR 谱拟合. 该程序可在 Windows 环境下运行, 界面友好, 操作简单.

References

- 1 Swartz, H. M.; Bolton, J. R.; Borg, D. C. Biological application of electron spin resonance. New York: Wiley-Interscience, 1972
- 2 Qiu, Z. W. Electron spin resonance spectrum. Beijing: Science Press, 1980 [裘祖文. 电子自旋共振波谱. 北京: 科学出版社, 1980]
- 3 Viney, C.; Huber, A. E.; Dunaway, D. L.; Kerkam, K.; Case, S. T. In: Silk polymers. Kaplan, D.; Adams, W. W.; Farmer, B.; Viney, C. eds. Washington: American Chemical Society, Vol. 544, 1994: 120
- 4 Magoshi, J.; Magoshi, Y.; Becker, M. A.; Nakamura, S. In: Polymer materials encyclopedia. Salamone, J. C. ed. New York: CRC Press, Vol. 1, 1996: 667
- 5 Zong, X.; Zhou, P.; Shao, Z.; Chen, S.; Chen, X.; Hu, B.; Deng, F.; Yao, W. *Biochemistry*, **2004**, **43**: 11932
- 6 Bleaney, F. *Philos. Mag.*, **1951**, **42**: 441
- 7 Toy, A. D.; Chaston, S. H. H.; Pilbrow, J. R.; Smith, T. D. *Inorg. Chem.*, **1971**, **10**: 2219
- 8 Lin, Q. S. *Chin. J. Magn. Reson.*, **1989**, **6**: 201 [林青松. 波谱学杂志(*Bopuxue Zazhi*), **1989**, **6**: 201]
- 9 Peisach, J.; Blumber, W. E. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1974**, **165**: 691
- 10 Gersmann, H. R.; Swalen, J. D. *J. Chem. Phys.*, **1962**, **36**: 3221
- 11 Sakaguchi, U.; Addison, A. W. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1979**, **4**: 600