疏水链长和温度对阳离子单链和 Gemini 表面活性剂的自组装以及与牛血清蛋白相互作用的影响

韩玉淳, 黄旭, 王毅琳*

中国科学院化学研究所, 胶体、界面与化学热力学实验室, 北京 100190

* 联系人, E-mail: yilinwang@iccas.ac.cn

2016-06-03 收稿, 2016-07-15 修回, 2016-07-17 接受, 2016-08-09 网络版发表

国家自然科学基金(21025313, 21021003)资助

摘要 利用等温滴定微量热方法研究了疏水链长和温度对六亚甲基-1,6-双(烷基二甲基溴化铵)($C_nC_6C_nBr_2$)和烷基三甲基溴化铵(C_nTAB)这两个系列表面活性剂的自组装以及与牛血清蛋白(BSA)相互作用的影响. 结果表明, 随着疏水链增长, 表面活性剂胶束化焓值(ΔH_{mic})变得更负, 胶束化自由能(ΔG_{mic})的变化主要来自于胶束化熵变(ΔS_{mic}). 温度对表面活性剂的临界胶束浓度(CMC)影响不大, 但对 ΔH_{mic} 影响较大, 在所研究的温度区间内的 ΔH_{mic} 都是负的, 而 $T\Delta S_{mic}$ 是正的, 并且 $T\Delta S_{mic}$ 的绝对值明显大于 ΔH_{mic} 的绝对值, 证明这些表面活性剂的胶束化过程都是熵驱动为主的. 随温度升高, 焓对胶束化过程的贡献越来越大, 而熵贡献越来越小. 多数表面活性剂与BSA相互作用的量热曲线呈现两个吸热过程和两个放热过程. 疏水链长的变化会显著影响第二个吸热过程和第二个放热过程. 温度会显著影响第二个吸热最大值的出现和强度. 相比于单链表面活性剂与BSA之间的相互作用, 疏水链长和温度对Gemini表面活性剂与BSA之间相互作用的影响更显著.

关键词 Gemini 表面活性剂, 牛血清蛋白, 等温滴定微量热, 相互作用, 温度效应

表面活性剂与蛋白质的复配体系在食品、化工、制药、化妆品和洗涤剂等领域具有广泛而重要的应用, 表面活性剂与蛋白质之间的相互作用会显著影响产品的质量, 因而相关研究一直是人们感兴趣的课题^[1-5]. 一些离子型表面活性剂可以通过头基静电结合到带有相反电荷的蛋白分子上, 并通过其疏水链与蛋白质的非极性残基之间产生疏水相互作用, 从而导致蛋白结构变化和生物活性丧失^[6-8]. 已有很多文献^[9-15]报道了离子型表面活性剂与蛋白质之间的相互作用, 然而大多集中于常见的单链表面活性剂, 如十二烷基硫酸钠(SDS)或者是烷基三甲基溴化铵(C_nTAB)等, 与蛋白质的相互作用. 近年来, 一类

新型的Gemini表面活性剂, 由于具有较低的临界胶束浓度、很强的表面活性、更好的润湿性和更强的疏水性等特点, 成为胶体界面科学及相关领域的研究热点^[16-18]. Gemini表面活性剂分子中含有2个亲水头基和2条疏水链, 由连接基团通过化学键将2个亲水头基连接在一起. 由于具有特殊结构和强的自组装能力, Gemini表面活性剂有望表现出更有效和高效的与蛋白质相互作用的行为.

已有一些研究者关注了Gemini表面活性剂与蛋白质之间的相互作用. 例如, Mir等人^[19]研究了牛血清蛋白(BSA)与单链表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、Gemini表面活性剂四亚甲基-1,4-双(十

引用格式: 韩玉淳, 黄旭, 王毅琳. 疏水链长和温度对阳离子单链和 Gemini 表面活性剂的自组装以及与牛血清蛋白相互作用的影响. 科学通报, 2016, 61: 3127-3136
Han Y C, Huang X, Wang Y L. Effects of hydrocarbon chain length and temperature on the self-assembly of cationic single-chain and Gemini surfactants and their interactions with bovine serum albumin (in Chinese). Chin Sci Bull, 2016, 61: 3127-3136, doi: 10.1360/N972016-00528

六基二甲基溴化铵(16-4-16)、聚氧乙烯醚(Brij58),以及基于三者的混合表面活性剂的相互作用. 结果表明,混合表面活性剂与BSA的结合能力与混合表面活性剂之间的作用强度相反,即混合表面活性剂之间作用越强,混合表面活性剂与BSA的作用越弱. 16-4-16与Brij58的混合表面活性剂使BSA失活的能力要比CTAB与Brij58的混合表面活性剂强. 混合表面活性剂通常会表现出比单一表面活性剂提高的性能. Bonincontro课题组^[20]的研究证明Gemini表面活性剂与BSA的结合与其带电状态有关,二者的结合以静电作用为主,不过疏水作用也有贡献. 一些特殊结构的Gemini表面活性剂也被用来与BSA相互作用. 例如, Gospodarczyk等人^[21]研究了含有咪唑头基的3个具有不同连接基团的Gemini表面活性剂3,3'-[1,6-(2,5-二乙氧己烷)]双(1-十二烷基氯化咪唑)(oxyC2)、3,3'-[1,16-(2,15-二乙氧十六烷)]双(1-十二烷基氯化咪唑)(oxyC12)和1,4-双(丁烷)-1-咪唑基-3-十二烷基氯化咪唑(C4)与BSA的相互作用. 结果表明,对于oxyC2和oxyC12, BSA的 α 螺旋含量随表面活性剂浓度增加下降显著. C4比oxyC2和oxyC12需要更高浓度才能诱导蛋白从正常折叠状态(N-form)转变到展开状态(E-form). Yaseen等人^[22]最近研究了Gemini表面活性剂对BSA纤维化的影响,发现常见的阳离子Gemini表面活性剂二亚甲基-1,2-双(烷基二甲基溴化铵)(*m*-C2-*m*, *m*=12, 14和16)会解聚BSA纤维,而连接基团上含有酯键的阳离子Gemini表面活性剂二酯基亚甲基-1,2-双(烷基二甲基溴化铵)(*m*-E2-*m*, *m*=12, 14, 16)会促进BSA纤维的形成. 不过,随着*m*-E2-*m*疏水链的增长,会发生轻微的纤维解聚. 作者认为*m*-C2-*m*胶束会破坏氢键作用,导致纤维的解聚;而*m*-E2-*m*上的酯键会促进氢键的形成,从而提高了纤维的含量.

本课题组也较早地开展了Gemini表面活性剂与蛋白质相互作用的研究. 本课题组^[23]对比研究了单链表面活性剂十二烷基三甲基溴化铵(DTAB)和具有不同连接基团长度的Gemini表面活性剂12-*s*-12(*s*=3, 6和12)与BSA的相互作用. 结果表明,12-*s*-12具有比DTAB强的结合BSA的能力,并且在12-*s*-12/BSA摩尔比非常低的条件下就发生结合. 由于具有较长的连接基团,12-12-12比12-3-12和12-6-12的疏水性强,因此与BSA的结合能力更强. 本文将研究疏水链长和温度对表面活性剂与BSA相互作用的影响. 疏水效应在生物过程中扮演着十分重要的角色^[24~26],因

此研究表面活性剂疏水链的长度对表面活性剂与蛋白质相互作用的影响有重要意义. 而由于疏水效应的温度依赖性,温度也必然对二者相互作用产生重要影响. 本文以阳离子单链表面活性剂 C_n TAB(*n*=10, 12, 14)和Gemini表面活性剂六亚甲基-1,6-双(烷基二甲基溴化铵)($C_nC_6C_nBr_2$, *n*=10, 12, 14)与BSA的相互作用为研究对象,利用等温滴定微量热技术从相互作用能量角度研究了疏水链长和温度对这两个系列阳离子表面活性剂与BSA相互作用的影响. 作为对比,也研究了疏水链长和温度对这两个系列阳离子表面活性剂的自组装过程的影响. 结果表明,在不同的表面活性剂浓度区间,表面活性剂与BSA的相互作用方式不同,疏水链长和温度在不同作用区间的影响程度不同. 相比于单链表面活性剂与BSA之间的相互作用,疏水链长和温度对Gemini表面活性剂与BSA之间相互作用的影响更显著.

1 实验

(i) 试剂. BSA(纯度为99%)是从Sigma公司购买,使用前经透析和冷冻干燥处理. Gemini表面活性剂 $C_nC_6C_nBr_2$ 是由 α,ω -二溴烷与 N,N -二甲基十二胺反应制备. C_n TAB由烷基溴和三甲基胺反应制备. 经¹H NMR, 质谱和元素分析验证,所有合成表面活性剂的化学结构正确且纯度符合实验要求. 在所有测定中保持BSA的浓度均在1.0 g/L (0.015 mmol/L). 所有样品均用浓度为0.02 mol/L, pH 7.0的磷酸缓冲溶液配置. 所使用的其他试剂均为分析纯,水为重蒸二次水.

(ii) 等温滴定微量热. 量热实验在TAM 2277-201微量量热仪(Thermometric AB, Järfälla, 瑞典)上进行. 不锈钢样品池体积为1 mL. 样品池最初放置0.6 mL的缓冲溶液(buffer)或者1.0 g/L的BSA溶液. 表面活性剂溶液由612 Thermometric Lund泵控制的Hamilton注射器(500 μ L)滴加到样品池中. 连续滴定33滴,每次滴定体积为6~10 μ L,直到达到所要的浓度范围. 搅拌速度为50 r/min. 实验温度分别为298.15, 303.15和313.15 K. 观察焓(ΔH_{obs})通过积分热流 $P(\mu W)$ 对时间 $t(s)$ 曲线上的峰面积得到.

2 结果与讨论

2.1 表面活性剂的胶束化

图1列出了在298.15, 303.15和313.15 K下,将

图1 在 298.15, 303.15 和 313.15 K 下, 不同链长的单链 C_{10} TAB(a), C_{12} TAB(b), C_{14} TAB(c)和 Gemini 表面活性剂 $C_{10}C_6C_{10}Br_2$ (d), $C_{12}C_6C_{12}Br_2$ (e), $C_{14}C_6C_{14}Br_2$ (f)分别滴加到缓冲溶液和BSA溶液中获得观察焓(ΔH_{obs})随表面活性剂浓度(C)的变化曲线

Figure 1 Variations of the observed enthalpies (ΔH_{obs}) versus the surfactant concentrations (C) for the titrations of single-chain surfactants C_{10} TAB (a), C_{12} TAB (b), C_{14} TAB (c) and Gemini surfactants $C_{10}C_6C_{10}Br_2$ (d), $C_{12}C_6C_{12}Br_2$ (e), $C_{14}C_6C_{14}Br_2$ (f) into the buffer (open symbols) and BSA (solid symbols) solutions at 298.15, 303.15, and 313.15 K, respectively

较高浓度的表面活性剂溶液分别滴加到缓冲溶液和BSA溶液中所得到的胶束化焓(ΔH_{obs})随表面活性剂浓度(C)的变化曲线。首先观察将表面活性剂溶液滴到缓冲溶液中所获得的量热曲线, 这些曲线都大致呈现S形状。在较低的表面活性剂浓度时, 可以观察到明显的吸热效应, 随着表面活性剂浓度增加, 该吸热效应明显降低并逐渐趋近于零。曲线上的临界浓度, 即观察焓开始明显下降时对应的表面活性剂浓度为临界胶束浓度(CMC), 如图2所示。当表面活性剂浓度低于CMC时, 滴到量热池中的胶束将解离,

观察焓包括胶束解离焓和单体稀释焓。当表面活性剂浓度高于CMC时, 滴到量热池中的胶束将不再解离, 这时的观察焓主要是胶束稀释焓。胶束化焓变(ΔH_{mic})是由曲线上2个线性部分外推至CMC处的焓变差值确定^[27,28](图2)。使用相分离模型来粗略地计算胶束化自由能(ΔG_{mic})。利用公式 $\Delta G_{mic}=RT(1+\beta)\ln X_{cmc}$ 和 $\Delta G_{mic}=2RT(0.5+\beta)\ln X_{cmc}$ (R 为气体常数, T 为绝对温度, β 为抗衡离子结合度, X_{cmc} 为用摩尔分数表示的临界胶束浓度)来计算 C_n TAB和 $C_nC_6C_nBr_2$ 的 ΔG_{mic} ^[29,30]。根据文献[31~33], 这些表面活性剂的抗

图 2 C_{12} TAB 在 303.15 K 下的胶束化焓曲线. 根据曲线可以确定 CMC 和 ΔH_{mic} 值

Figure 2 Determination of the CMC and ΔH_{mic} from the calorimetric titration curve of C_{12} TAB into buffer at 303.15 K

衡离子结合度数值比较接近, 在本文采用近似的抗衡离子结合度数值 0.8 计算 ΔG_{mic} . 胶束化过程的熵变 (ΔS_{mic}) 利用吉布斯-亥姆霍兹方程 $\Delta S_{mic} = (\Delta H_{mic} - \Delta G_{mic})/T$ 计算得到. 我们用以上方法得到每个表面活性剂在不同温度下的 CMC, ΔH_{mic} , ΔG_{mic} 和 ΔS_{mic} 值, 结果列于表 1 中.

(i) 疏水链长的影响. 在同一温度下, 随着疏

水链的增长, 表面活性剂的 CMC 值降低. 并且由于 $C_nC_6C_nBr_2$ 有 2 个疏水链, 其 CMC 值也明显小于 C_n TAB 的 CMC 值. 以 298.15 K 时为例, 随着表面活性剂疏水链增长, ΔH_{mic} 值变得更负. 对于 C_n TAB 和 $C_nC_6C_nBr_2$ 这 2 个系列的表面活性剂, 每增加 1 个 CH_2 基团, ΔH_{mic} 的降低值分别是 ~ 0.73 和 ~ 0.85 kJ/mol, 这低于一般表面活性剂在纯水中的降低值, 这应该与缓冲溶液盐的存在有关. 在 298.15 K 时, 对于 C_n TAB 和 $C_nC_6C_nBr_2$, 每增加 1 个 CH_2 基团, ΔG_{mic} 的降低值分别为 4.2 和 4.4 kJ/mol, 而 ΔS_{mic} 增加值分别为 11.8 和 12.0 J/(mol K). 以上结果表明 ΔG_{mic} 的变化主要来自于 ΔS_{mic} 的变化.

(ii) 温度的影响. 观察在不同温度下表面活性剂滴到缓冲溶液中的量热曲线, 发现温度只对表面活性剂 CMC 之前的 ΔH_{obs} 值有显著影响, 而对 CMC 之后的胶束稀释焓影响不大. 从表 1 的数据可以看出在所研究的温度范围内, 温度对表面活性剂 CMC 值的影响不大, 对 ΔH_{mic} 的影响较大. 这些表面活性剂在所研究的温度区间内的 ΔH_{mic} 都是负的, 而 $T\Delta S_{mic}$ 是正的, 并且 $T\Delta S_{mic}$ 的绝对值明显大于 ΔH_{mic} 的绝对值, 证明这些表面活性剂的胶束化过程都是以熵驱动为主. 对于 C_n TAB 和 $C_{10}C_6C_{10}Br_2$ 表面活性剂, 温度对

表 1 不同表面活性剂在不同温度下胶束化过程的热力学参数

Table 1 Thermodynamic parameters of micellization for the different surfactants at different temperatures

	$T(K)$	CMC(mmol/L)	$\Delta H_{mic}(kJ/mol)$	$\Delta G_{mic}(kJ/mol)$	$T\Delta S_{mic}(kJ/mol)$
C_{10} TAB	298.15	78.70	-1.3	-29.3	28.0
	303.15	77.47	-2.0	-29.8	27.8
	313.15	74.35	-4.1	-31.0	26.9
C_{12} TAB	298.15	14.75	-2.4	-36.7	34.3
	303.15	13.15	-3.6	-37.9	34.3
	313.15	12.90	-6.7	-39.2	32.5
C_{14} TAB	298.15	2.60	-4.2	-44.5	40.3
	303.15	2.36	-4.8	-45.7	40.9
	313.15	2.06	-8.1	-47.8	39.7
$C_{10}C_6C_{10}Br_2$	298.15	7.92	-2.9	-57.1	54.2
	303.15	7.54	-3.9	-58.3	54.4
	313.15	6.25	-7.4	-61.5	54.1
$C_{12}C_6C_{12}Br_2$	298.15	0.46	-7.6	-75.4	67.8
	303.15	0.50	-6.1	-76.1	70.0
	313.15	0.17	-11.3	-85.9	74.6
$C_{14}C_6C_{14}Br_2$	298.15	0.067	-9.7	-87.8	78.1
	303.15	0.067	-6.0	-87.8	81.8
	313.15	0.067	-5.2	-87.8	82.6

ΔH_{mic} 的影响是一致的,即温度升高引起 ΔH_{mic} 降低。通常, ΔH_{mic} 会随着温度的升高而降低^[34-37]。虽然疏水链、头基和反离子都在表面活性剂的胶束化过程中起作用,但是胶束形成的主要驱动力还是疏水相互作用,也就是疏水部分彼此靠近以避免和水接触的作用力^[38],因此胶束化焓变的温度依赖应该归因于疏水效应的温度依赖性^[39,40]。Zana课题组^[16]认为在胶束化过程中,烷基链转移对胶束化焓变有2个方面的贡献,一个是烷基链周围结构水的破坏将引起吸热的焓变,另一个是烷基链在胶束核内的聚集会引起放热的焓变。升高温度会破坏结构水,因而会降低第1个贡献,但是对第2个贡献的影响非常小,结果导致胶束化焓变的降低。 ΔS_{mic} 也会随着温度的升高而降低,众所周知,由于水分子之间的氢键作用,水趋向于在非极性分子周围形成有序的笼型结构,即“冰山结构”。同样地,在表面活性剂单体疏水部分周围也会有这种“冰山结构”,而胶束化过程会大大破坏这种“冰山结构”,从而导致显著的熵增,温度升高会引起表面活性剂单体疏水部分周围有序水分子的数目降低^[41],因而胶束化过程的熵增也会变小。 ΔH_{mic} 和 ΔS_{mic} 同时降低对 ΔG_{mic} 的变化有一个相反的影响,在目前体系中, ΔG_{mic} 随温度的变化不大,仅轻微降低。根据焓熵补偿原理^[42], ΔH_{mic} 的降低值超过了 ΔS_{mic} 的降低值,即 ΔG_{mic} 随温度的变化主要来自 ΔH_{mic} ,在我们的体系中,表面活性剂的胶束化过程都是熵驱动为主的,只不过随温度的升高,焓对胶束化过程的贡献越来越大,而熵贡献越来越小。对于 $\text{C}_{12}\text{C}_6\text{C}_{12}\text{Br}_2$ 和 $\text{C}_{14}\text{C}_6\text{C}_{14}\text{Br}_2$ 这2个表面活性剂, ΔH_{mic} 和 ΔS_{mic} 随温度的变化不遵循一般规律,尤其是 $\text{C}_{14}\text{C}_6\text{C}_{14}\text{Br}_2$ 的 ΔH_{mic} 随着温度的升高反而变大。这可能是因为在这2个体系的缓冲溶液中盐的浓度已经超过了表面活性剂的浓度,反离子在胶束化过程中去水合所吸收的热量将不能忽略^[34],盐效应和温度效应共同影响了这两个表面活性剂胶束化焓变。

2.2 表面活性剂与BSA的相互作用

当把表面活性剂溶液滴到BSA溶液中时,除了 C_{10}TAB ,其他表面活性剂与BSA相互作用的量热曲线都明显不同于单独表面活性剂的稀释曲线。对于 C_{10}TAB ,相互作用的量热曲线与稀释曲线是几乎重合的,表明它与BSA没有发生明显的相互作用。其他表面活性剂与BSA相互作用的量热曲线都呈现大致

相同的变化趋势。可以根据量热曲线的特征变化,分成5个作用区间:(A)当表面活性剂浓度很低时, ΔH_{obs} 是很强的吸热值并逐渐增加达到第1个吸热最大值;(B)随着表面活性剂浓度增加, ΔH_{obs} 开始降低并达到第1个吸热最小值;(C)然后 ΔH_{obs} 又有一个轻微的升高并达到第2个吸热最大值;(D) ΔH_{obs} 随着表面活性剂浓度的升高再一次逐渐下降并达到第2个吸热最小值;(E)相互作用的量热曲线开始与单独表面活性剂的稀释曲线重合。

根据以上量热结果,并结合文献,设想了可能的作用机理,如图3所示。在区间(A),当表面活性剂溶液注入样品池中后,胶束解离成单体。BSA在pH 7.0缓冲溶液中的净电荷为负,与带有正电荷的阳离子表面活性剂单体能够通过静电吸引特异性地结合。BSA分子和表面活性剂分子头基的去水合作用导致了吸热效应,并获得第1个吸热最大值^[43]。在区间(B),随着表面活性剂浓度增加,表面活性剂分子开始协同性地结合到BSA分子上,即自由的表面活性剂分子和已经结合到BSA上的分子之间通过疏水相互作用缔合成“类胶束”聚集体,这种结合促使BSA分子部分地展开,降低的 ΔH_{obs} 可以证明“类胶束”聚集体的生成,因为“类胶束”聚集体形成过程与表面活性剂胶束化过程一样是放热的。“类胶束”聚集体开始形成时对应的表面活性剂浓度为临界聚集浓度(CAC)。在区间(C),随着表面活性剂浓度进一步增加, ΔH_{obs} 有一个轻微的上升。在此过程中,由于在BSA分子上有更多的“类胶束”聚集体形成,从而导致BSA分子构型在很大程度上发生变化,引起吸热的能量。另外,由于BSA分子的展开,将暴露更多的结合位点,促使表面活性剂再一次通过静电结合到BSA上,发生去水合作用,引起 ΔH_{obs} 轻微上升并达到第2个吸热最大值。在区间(D),当表面活性剂浓度继续增加,虽然表面活性剂浓度已经超过了CMC,但是由于与BSA的结合,自由表面活性剂分子的浓度还没有达到CMC,加入的表面活性剂胶束将部分解离,部分以胶束形式直接结合到BSA分子上,直到BSA分子被表面活性剂完全饱和。吸热最小值对应的表面活性剂浓度是BSA分子被饱和的浓度(C_2)。在区间(E),在更高的表面活性剂浓度,相互作用的量热曲线与表面活性剂的稀释曲线是重合的,表明表面活性剂与BSA不再发生相互作用。此时自由表面活性剂的浓度已经超过了CMC,表面活性剂开始形

图3 (网络版彩色)298.15 K时 $C_{12}C_6C_{12}Br_2$ 分别加入缓冲溶液和BSA溶液中的量热曲线. 图中给出了表面活性剂与BSA相互作用的不同浓度区间和可能的相互作用机理, 以及CAC, C_2 和 C_m 的确定方法

Figure 3 (Color online) Schematic diagram describing the possible interaction mechanism for the surfactants and BSA, taking the calorimetric curves of the $C_{12}C_6C_{12}Br_2$ titrated into buffer and BSA at 298.15 K as the example. The estimation of critical aggregation concentration (CAC), the saturation concentration (C_2), and critical concentration (C_m) are also shown in this figure

成自由的胶束, 此时的 ΔH_{obs} 仅仅是胶束的稀释焓. 自由表面活性剂开始形成胶束时的浓度定义为(C_m)^[44]. 按图3所示方法估计了CAC, C_2 和 C_m 的值(C_2 和 C_m 的误差较大), 结果列于表2中.

(i) 疏水链长的影响. 随着疏水链的增长, 相互作用量热曲线与单独表面活性剂稀释曲线的差别越来越大, 并且 $C_nC_6C_nBr_2$ 系列表面活性剂的差别要强于 C_nTAB 系列. 相互作用的量热曲线存在2个吸热

表2 表面活性剂在BSA溶液中的CAC, C_2 和 C_m

Table 2 CAC, C_2 and C_m values for the different surfactants in the presence of BSA at the different temperatures

	<i>T</i> (K)	CAC (mmol/L)	<i>C</i> ₂ (mmol/L)	<i>C</i> _m (mmol/L)
<i>C</i> ₁₀ TAB/BSA	298.15	—	—	—
	303.15	—	—	—
	313.15	—	—	—
<i>C</i> ₁₂ TAB/BSA	298.15	6.62	13.83	15.36
	303.15	6.51	13.73	14.05
	313.15	4.86	13.72	13.83
<i>C</i> ₁₄ TAB/BSA	298.15	0.95	3.31	3.97
	303.15	0.95	2.98	3.38
	313.15	0.64	4.87	4.87
<i>C</i> ₁₀ <i>C</i> ₆ <i>C</i> ₁₀ Br ₂ /BSA	298.15	0.58	4.92	7.62
	303.15	0.58	4.80	7.70
	313.15	0.54	4.33	5.82
<i>C</i> ₁₂ <i>C</i> ₆ <i>C</i> ₁₂ Br ₂ /BSA	298.15	0.16	0.85	1.05
	303.15	0.15	0.72	0.72
	313.15	0.16	0.60	0.60
<i>C</i> ₁₄ <i>C</i> ₆ <i>C</i> ₁₄ Br ₂ /BSA	298.15	0.02	0.42	0.42
	303.15	0.06	0.46	0.46
	313.15	0.08	0.47	0.69

最大值,在区间(A)中的第1个吸热最大值会随着烷基链长度的增加而变大,证明表面活性剂除了静电结合,疏水链与BSA分子上疏水片段之间的疏水缔合在区间(A)也起到了作用.研究者已经利用核磁技术证明了无论是表面活性剂的头基还是疏水链都与蛋白发生缔合^[45,46].在区间(B)中,对2个系列的表面活性剂而言,疏水链的增长对于它们与BSA的相互作用没有明显的影响.但是对于 $C_nC_6C_nBr_2$ 表面活性剂, ΔH_{obs} 的降低程度明显大于 C_nTAB ,表明在BSA链上形成了更多的“类胶束”聚集体.疏水链长的变化会显著影响区间(C)中第2个吸热最大值的出现和幅度.这是因为随着疏水链的增长,表面活性剂与BSA的疏水缔合作用更强,导致BSA分子更大程度展开,构型变化会吸收更多的热量,因此第2个吸热最大值更大.在区间(D)中,随着疏水链的增长, ΔH_{obs} 的降低程度明显变大,尤其是 $C_{14}TAB$,相互作用的 ΔH_{obs} 甚至降低到比单独表面活性剂的稀释焓曲线的 ΔH_{obs} 还要低.总之,在每一个相互作用区间都存在表面活性剂与BSA之间的疏水缔合作用,然而其不同作用区间的影响程度是不同的.对区间(A)和(B)的影响较小,而对于区间(C)和(D)的影响较大,这是因为,疏水链长主要影响“类胶束”聚集体形成过程的焓变,而“类胶束”聚集体主要是在表面活性剂浓度较高时大量形成.从表2可以看出,随着疏水链长增加, CAC , C_2 和 C_m 的数值都明显降低,证明表面活性剂疏水作用增强提高了表面活性剂与BSA结合以及诱导BSA构型改变的效率.

(ii) 温度的影响.很明显,温度也会对表面活性剂与蛋白之间的相互作用产生影响.已有研究者^[39,47]提出,表面活性剂与蛋白质相互作用的温度依赖可能与表面活性剂是以胶束形式而不是以单体形式结合到蛋白上有关,或者是在结合过程中有“类胶束”聚集体的形成.正如以上讨论过的,在区间(B), (C)和(D)都有“类胶束”聚集体形成,所以温度应该对这3个作用区间有影响.从图1能够观察到温度对区间(B)和(C)确实有很明显的影响,尤其是温度会影响第2个吸热最大值的出现和强度.随着温度的升高,第2个吸热最大值变得越来越小,甚至消失.原因一方面是蛋白分子构型会随着温度升高而改变,蛋白的结构在高温会变得更加松散^[26,48,49].因此温度较高时,BSA分子在区间(B)就已经很大程度地展开了,这样在区间(C)就不会有明显的构型变化;另一方面,温度升高引起的BSA分子展开将暴露出更多

的疏水区,从而增强了表面活性剂与BSA之间的疏水缔合作用,导致区间(B)中更大的放热过程.区间(B)中“类胶束”聚集体形成过程的焓变也会随着温度升高而变得更加放热,也是导致区间(B)中 ΔH_{obs} 显著降低的原因,进而影响了区间(C)中吸热峰的出现和强度.另外,温度对 $C_nC_6C_nBr_2$ 与BSA相互作用的影响也比对 C_nTAB 与BSA相互作用的影响更强.从表2可以看出,温度对 CAC , C_2 和 C_m 的数值影响不显著,并且对于不同表面活性剂的影响效果不同,这可能与温度同时影响了表面活性剂/BSA之间相互作用的强弱以及BSA自身构型有关.

3 结论

利用等温滴定微量热研究了疏水链长和温度对 $C_nC_6C_nBr_2$ 和 C_nTAB 这2个系列表面活性剂的自组装以及BSA相互作用的影响.对于表面活性剂的自组装,随着表面活性剂疏水链增长, ΔH_{mic} 变得更加放热.以298.15 K时的数据为例,对于 C_nTAB 和 $C_nC_6C_nBr_2$ 这2个系列的表面活性剂,每增加1个 CH_2 基团, ΔH_{mic} 的降低值分别是 ~ 0.73 和 ~ 0.85 kJ/mol, ΔG_{mic} 的降低值分别为4.2和4.4 kJ/mol,而 ΔS_{mic} 增加值分别为11.8和12.0 J/(mol K),因此 ΔG_{mic} 的变化主要来自于 ΔS_{mic} 的变化.温度对表面活性剂的临界胶束浓度(CMC)影响不大,对 ΔH_{mic} 影响较大,这些表面活性剂在所研究的温度区间内的 ΔH_{mic} 都是负的,而 $T\Delta S_{mic}$ 是正的,并且 $T\Delta S_{mic}$ 的绝对值明显大于 ΔH_{mic} 的绝对值,证明这些表面活性剂的胶束化过程都是熵驱动为主,随温度升高,焓对胶束化过程的贡献越来越大,而熵贡献越来越小.对于表面活性剂与BSA的相互作用,多数量热曲线呈现2个吸热过程和2个放热过程,同时伴随有2个吸热最大值的出现.疏水链长的变化会显著影响第2个吸热过程和第2个放热过程,这是因为这2个过程与“类胶束”聚集体的大量形成有关,而“类胶束”聚集体在较高表面活性剂浓度时更容易形成.温度会显著影响第2个吸热最大值的出现和强度,一方面是因为温度升高会导致BSA提前展开,另一方面,温度升高也会使“类胶束”聚集体生成焓变得更负,从量热曲线上表现为第1个放热过程中的 ΔH_{obs} 的显著降低,进而影响了第2个吸热最大值的出现和强度.相比于单链表面活性剂与BSA之间的相互作用,疏水链长和温度对Gemini表面活性剂与BSA之间相互作用的影响更显著.

参考文献

- McClements D J. Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004
- Jones M N. Surfactant interactions with biomembranes and proteins. *Chem Soc Rev*, 1992, 21: 127–136
- Kelley D, McClements D J. Interaction of bovine serum albumin with ionic surfactants in aqueous solutions. *Food Hydrocolloid*, 2003, 17: 73–86
- Takeda K, Hachiya K, Moriyama Y. Interaction of Protein with Ionic Surfactants: Part 1, 2. New York: Marcel Dekker, 2002
- Nielsen A D, Arleth L, Westh P. Interaction of humicola insolens cutinase with an anionic surfactant studied by small-angle neutron scattering and isothermal titration calorimetry. *Langmuir*, 2005, 21: 4299–4307
- Sun C, Yang J, Wu X, et al. Unfolding and refolding of bovine serum albumin induced by cetylpyridinium bromide. *Biophys J*, 2005, 88: 3518–3524
- Mikšovská J, Yom J, Diamond B, et al. Spectroscopic and photothermal study of myoglobin conformational changes in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 476–482
- Lee C T, Smith K A, Hatton T A. Photocontrol of protein folding: The interaction of photosensitive surfactants with bovine serum albumin. *Biochemistry*, 2005, 44: 524–536
- Chakraborty A, Seth D, Setua P, et al. Photoinduced electron transfer in a protein-surfactant complex: Probing the interaction of SDS and BSA. *J Phys Chem B*, 2006, 110: 16607–16617
- De S, Girigoswami A, Das S. Fluorescence probing of albumin-surfactant interaction. *J Colloid Interface Sci*, 2005, 285: 562–573
- Ruso J M, Deo N, Somasundaran P. Complexation between dodecyl sulfate surfactant and zein protein in solution. *Langmuir*, 2004, 20: 8988–8991
- Fainerman V B, Zholob S A, Leser M E, et al. Adsorption from mixed ionic surfactant/protein solutions: Analysis of ion binding. *J Phys Chem B*, 2004, 108: 16780–16785
- Ghosh S, Banerjee A. A multitechnique approach in protein/surfactant interaction study: Physicochemical aspects of sodium dodecyl sulfate in the presence of trypsin in aqueous medium. *Biomacromolecules*, 2002, 3: 9–16
- Vasilescu M, Angelescu D. Interactions of globular proteins with surfactants studied with fluorescence probe methods. *Langmuir*, 1999, 15: 2635–2643
- Gimel J C, Brown W. A light scattering investigation of the sodium dodecyl sulfate-lysozyme system. *J Chem Phys*, 1996, 104: 8112–8117
- Zana R, Xia J. Gemini Surfactants: Synthesis, Interfacial and Solution-Phase Behavior, and Applications. New York: Marcel Dekker, 2004
- Menger F M, Littau C A. Gemini surfactants: A new class of self-assembling molecules. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 10083–10090
- Han Y C, Wang Y L. Aggregation behavior of gemini surfactants and their interaction with macromolecules in aqueous solution. *Phys Chem Chem Phys*, 2011, 13: 1939–1956
- Mir M A, Gull N, Khan J M, et al. Interaction of bovine serum albumin with cationic single chain+nonionic and cationic gemini+nonionic binary surfactant mixtures. *J Phys Chem B*, 2010, 114: 3197–3204
- Tardioli S, Bonincontro A, Mesa C L, et al. Interaction of bovine serum albumin with gemini surfactants. *J Colloid Interface Sci*, 2010, 347: 96–101
- Gospodarczyk W, Szutkowski K, Kozak M. Interaction of bovine serum albumin (BSA) with Novel gemini surfactants studied by synchrotron radiation scattering (SR-SAXS), circular dichroism (CD), and nuclear magnetic resonance (NMR). *J Phys Chem B*, 2014, 118: 8652–8661
- Yaseen Z, Rehman S U, Tabish M, et al. Modulation of bovine serum albumin fibrillation by ester bonded and conventional gemini surfactants. *RSC Adv*, 2015, 5: 58616–58624
- Li Y J, Wang X Y, Wang Y L. Comparative studies on interactions of bovine serum albumin with cationic gemini and single-chain surfactants. *J Phys Chem B*, 2006, 110: 8499–8505
- Peyre V, Lair V, André V, et al. Detergent binding as a sensor of hydrophobicity and polar interactions in the binding cavities of proteins. *Langmuir*, 2005, 21: 8865–8875
- Akiyoshi K, Nishikawa T, Mitsui Y, et al. Self-assembly of polymer amphiphiles: Thermodynamics of complexation between bovine serum albumin and self-aggregate of cholesterol-bearing pullulan. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, 1996, 112: 91–95

- 26 Chen W Y, Lin C C, Lin F Y, et al. Effect of temperature on hydrophobic interaction between proteins and hydrophobic adsorbents—Studies by isothermal titration calorimetry and the van't Hoff equation. *Langmuir*, 2003, 19: 9395–9403
- 27 Kreshech G C, Haragraves W A. Thermometric titration studies of the effect of headgroup, chain length, solvent, and temperature on the thermodynamics of micelle formation. *J Colloid Interface Sci*, 1974, 48: 481–493
- 28 Johnson I, Olofsson G, Jönsson B. Micelle formation of ionic amphiphiles. *J Chem Soc Faraday Trans*, 1987, 83: 3331–3344
- 29 Zana R. Critical Micellization concentration of surfactants in aqueous solution and free energy of micellization. *Langmuir*, 1996, 12: 1208–1211
- 30 Huang X, Han Y C, Wang Y X, et al. Aggregation behavior of nitrophenoxy-tailed quaternary ammonium surfactants. *J Phys Chem B*, 2007, 111: 12439–12446
- 31 Moulik S P, Haque M E, Das A R. Micellar properties of cationic surfactants in pure and mixed states. *J Phys Chem*, 1996, 100: 701–708
- 32 Chakraborty I, Moulik S P. Self-aggregation of ionic C10 surfactants having different headgroups with special reference to the behavior of decyltrimethylammonium bromide in different salt environments: A calorimetric study with energetic analysis. *J Phys Chem B*, 2007, 111: 3658–3664
- 33 Grosmaire L, Chorro M, Chorro C, et al. Alkanediyl- α,ω -bis(dimethylalkylammonium bromide) surfactants 9. Effect of the spacer carbon number and temperature on the enthalpy of micellization. *J Colloid Interface Sci*, 2002, 246: 175–181
- 34 Beyer K, Leine D, Blume A. The demicellization of alkyltrimethylammonium bromides in 0.1 mol/L sodium chloride solution studied by isothermal titration calorimetry. *Colloids Surf B*, 2006, 49: 31–39
- 35 Kreshech G C. A Calorimetric determination of the standard enthalpy and heat capacity changes that accompany micelle formation for four long chain alkyldimethylphosphine oxides in H₂O and D₂O solution from 15 to 79°C. *J Am Chem Soc*, 1998, 120: 10964–10969
- 36 Paula S, Süss W, Tuchtenhagen J, et al. Thermodynamics of micelle formation as a function of temperature: A high sensitivity titration calorimetry study. *J Phys Chem*, 1995, 99: 11742–11751
- 37 Bashford M T, Woolley E M. Enthalpies of dilution of aqueous decyl-, dodecyl-, tetradecyl-, and hexadecyltrimethylammonium bromides at 10, 25, 40, and 55 °C. *J Phys Chem*, 1985, 89: 3173–3179
- 38 Bijma K, Engberts B F N. Thermodynamics of micelle formation by 1-methyl-4-alkylpyridinium halides. *Langmuir*, 1994, 10: 2578–2582
- 39 Thongngam M, McClements D J. Influence of pH, ionic strength, and temperature on self-association and interactions of sodium dodecyl sulfate in the absence and presence of chitosan. *Langmuir*, 2005, 21: 79–86
- 40 Wangsakan A, Chinachoti P, McClements D J. Isothermal titration calorimetry study of the influence of temperature, pH and salt on maltodextrin-anionic surfactant interactions. *Food Hydrocolloid*, 2006, 20: 461–467
- 41 Muller N. Search for a realistic view of hydrophobic effects. *Acc Chem Res*, 1990, 23: 23–28
- 42 Cornish-bowden A. Enthalpy-entropy compensation: A phantom phenomenon. *J Biosci*, 2002, 27: 121–126
- 43 Li Y J, Cao M W, Wang Y L. Alzheimer amyloid β (1-40) peptide: Interactions with cationic gemini and single-chain surfactants. *J Phys Chem B*, 2006, 110: 18040–18045
- 44 Dai S, Tam K C. Isothermal titration calorimetry studies of binding interactions between polyethylene glycol and ionic surfactants. *J Phys Chem B*, 2001, 105: 10759–10763
- 45 Oakes J. Magnetic-resonance studies of the interactions between bovine-serum albumin. 1. Nature of binding site. *Eur J Biochem*, 1973, 36: 553–558
- 46 Oakes J. Magnetic-resonance studies of the interactions between bovine-serum albumin. 2. Effects of surfactants on the structure of bovine-serum albumin. *Eur J Biochem*, 1973, 36: 559–563
- 47 Thongngam M, McClements D J. Isothermal titration calorimetry study of the interaction between chitosan and a bile salt (sodium taurocholate). *Food Hydrocolloid*, 2005, 19: 813–819
- 48 Banerjee T, Singh S K, Kishore N. Binding of naproxen and amitriptyline to bovine serum albumin: Biophysical aspects. *J Phys Chem B*, 2006, 110: 24147–24156
- 49 Singh S K, Kishore N. Thermodynamic insights into the binding of triton X-100 to globular proteins: A calorimetric and spectroscopic investigation. *J Phys Chem B*, 2006, 110: 9728–9737

Effects of hydrocarbon chain length and temperature on the self-assembly of cationic single-chain and Gemini surfactants and their interactions with bovine serum albumin

HAN YuChun, HUANG Xu & WANG YiLin

Key Laboratory of Colloid and Interface Science of Chinese Academy of Sciences, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Protein-surfactant interaction has been a subject of extensive studies over the past few decades due to its importance in manifold applications, such as food industry, drug delivery, skin and body care products, and cosmetics. Mild surfactants are often used to extract membrane proteins while preserving native structure and functional properties of protein, whereas the strong ionic surfactants are known to bind to oppositely charged protein molecules, resulting in denaturation of native protein and complete loss of protein activity. In general, the ionic surfactants bind strongly to protein through electrostatic attraction between surfactant headgroups and oppositely charged amino acids residues, and through hydrophobic interaction between surfactant hydrophobic tails and non-polar amino acids residues. Extensive studies on the interactions between ionic surfactants and protein have been reported. However, most of them focus on single-chain surfactants such as sodium dodecyl sulfate (SDS) or alkyltrimethylammonium bromide (C_n TAB). In recent years, cationic gemini surfactant, a kind of surfactant consisting of two identical hydrophobic chains and two polar headgroups covalently linked by a spacer group, has stimulated the considerable interests due to its lower critical micelle concentration (CMC), stronger surface activity, better solubility, stronger hydrophobic microdomain, and so on. Thus, gemini surfactant is expected to exhibit quite different interaction behavior with protein from single-chain surfactant. This work has investigated the effect of hydrophobic chain length and temperature on the self-assembly of two series of cationic surfactants, gemini hexamethylene-1,6-bis(alkyldimethylammonium bromide) ($C_nC_6C_nBr_2$, $n=10, 12$, and 14) and single-chain alkyl trimethylammonium bromide (C_n TAB, $n=10, 12, 14$), and their interactions with BSA using well-established ITC technique. For the surfactant self-assembly process, the micellization enthalpy change (ΔH_{mic}) values are more exothermic with the hydrophobic chain increasing. The free energy changes of micellization (ΔG_{mic}) mainly come from the micellization entropy changes (ΔS_{mic}). Temperature has a slight effect on the critical micelle concentration (CMC), but it has a significant effect on the ΔH_{mic} . In the studied temperature range, the ΔH_{mic} values are negative, whereas the ΔS_{mic} values are positive, and the absolute values of $T\Delta S_{mic}$ are larger than those of ΔH_{mic} , proving the micellization process is mainly entropy-driven. With the temperature increasing, the contribution of enthalpy change to the micellization becomes larger, whereas the contribution of entropy change to the micellization becomes smaller. For the surfactant and bovine serum albumin (BSA) interaction process, at different surfactant concentration regions, the binding of the surfactants with BSA shows different interaction patterns. For most calorimetric curves of interactions, two endothermic and two exothermic processes are observed, and accompanied by two endothermic peaks. The first endothermic process is the dehydration of BSA upon the binding of the surfactant monomers. The first exothermic process involves the interaction of the surfactant monomers with surfactant molecules already bound on BSA molecule and the resultant formation of the micelle-like hydrophobic aggregates. The protein conformation change and the further dehydration of BSA molecules account for the second endothermic process. The following second exothermic process is the binding of surfactant monomers or micelles to BSA again leads to the formation of more micelle-like aggregates along the unfolded BSA molecules. The hydrophobic chain length remarkably affects the second endothermic process and the second exothermic process. This is because these two processes relate to the formation of the micelle-like aggregates along the BSA chain, whereas the micelle-like aggregates are easily formed at relatively high surfactant concentration range. The temperature has a marked effect on the protein/surfactant interaction in the first exothermic process and the second endothermic process. In particular, temperature strongly affects the appearance and amplitude of the second maximum endothermic peak, which can be explained by the effect of temperature on the protein conformation and the enthalpy change of micellization. In addition, gemini surfactants show much stronger binding ability with BSA as compared with single-chain surfactants due to their double hydrophobic chains and double charges.

Gemini surfactant, bovine serum albumin, isothermal titration calorimetry, interaction, temperature effect

doi: 10.1360/N972016-00528