

• 制剂与质量 •

电喷雾离子阱质谱法研究射干苷与血浆蛋白的非共价结合

曹 玘, 韩凤梅, 陈 勇*

(湖北大学 中药生物技术省重点实验室, 湖北 武汉 430062)

摘 要:目的 研究射干苷与血浆蛋白的非共价结合特性。方法 采用电喷雾离子阱质谱分别测定射干苷、人血清白蛋白、 α_1 -酸性糖蛋白及其所形成复合物的相对分子质量。通过结合前后的相对分子质量的变化计算复合物最大化学计量比;通过 Scatchard 方程拟合计算复合物结合常数 K ;根据反应温度和热力学常数 ΔH 、 ΔS 推测复合物间的作用力类型。结果 射干苷与人血清白蛋白、 α_1 -酸性糖蛋白形成的非共价复合物 K 分别为 1.914×10^4 mol/L 和 5.893×10^4 mol/L, 结合倍数分别为 7.8 和 3.3, 复合物间的作用力主要为静电引力。结论 电喷雾离子阱质谱法应用于射干苷与蛋白质结合的研究具有灵敏度高、特异性强、分析迅速等优点。

关键词:射干苷;人血清白蛋白; α_1 -酸性糖蛋白;电喷雾离子阱质谱

中图分类号:R285.6; R286.02 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2007)10-1473-04

Non-covalent binding between tectoridin and plasma proteins by electrospray ion trap mass spectrometry

CAO Yi, HAN Feng-mei, CHEN Yong

(Hubei Provincial Key Laboratory of Bio-Technology of Traditional Chinese Medicine,
Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: **Objective** To study the non-covalent binding between the tectoridin (TE) and plasma proteins. **Methods** The molecular weights of TE, human serum albumin (HSA), α_1 -acid glycoprotein (AAG) and the protein-drug complexes were measured by the electrospray ion trap mass spectrometry (ESI-MS). The maximum stoichiometric ratios were obtained according to the molecular weight change of the complexes before and after binding reaction. The binding constants (K) of the complexes were calculated by the Scatchard equation. The main sorts of binding force of the complexes were deduced according to the relationship between the reaction temperature and the thermodynamic parameters (ΔH and ΔS). **Results** The K of the complexes were 1.914×10^4 mol/L for TE-HSA and 5.893×10^4 mol/L for TE-AAG, and the number of binding sites were 7.8 and 3.3, respectively. The main sorts of binding force between TE-HSA or TE-AAG were static-electricity gravitation. **Conclusion** ESI-MS is a good method for studying of the TE-protein non-covalent binding with some advantages in sensitivity, high-speed, and accuracy.

Key words: tectoridin (TE); human serum albumin (HSA); α_1 -acid glycoprotein (AAG); electrospray ion trap mass spectrometry (ESI-MS)

许多药物可与血浆蛋白可逆结合形成非共价结合复合物,这种结合态药物不容易通过细胞膜进入血液,因此,对药物的体内过程、作用强度和持续时间有重要影响^[1]。人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)和 α_1 -酸性糖蛋白(α_1 -acid glycoprotein, AAG)是人血浆中与药物结合的两种主要蛋白组分。目前,研究药物与蛋白结合的方法有光谱法、色谱法、NMR 法、X 射线晶体衍射法和质谱法等。

与这些方法相比,电喷雾质谱(ESI-MS)具有样品用量少、灵敏度高、特异性强、分析快速和复合物化学计量比准确等优点^[2~5]。因此,本实验采用该技术研究了射干苷(tectoridin, TE)与 HSA 和 AAG 之间的非共价结合特性,如稳定常数、最大化学结合计量比和主要作用力类型等,这对阐明 TE 在血液中的存在状态和转运过程等有十分积极的作用。

1 仪器与材料

收稿日期:2006-12-21

基金项目:湖北省杰出青年基金资助项目(2002AC004);中药生物技术省重点实验室开放基金项目(040106)

* 通讯作者 陈 勇 Tel/Fax: (027)88663590 E-mail: cy101610@npc.gov.cn

美国 Finnigan 公司 LCQ^{DUO} 型质谱仪, 包括电喷雾电离源, TSP AS3000 自动进样器, 样品相对分子质量分析使用仪器自带的 Xcalibur 软件; TE 为本实验室制备, 质量分数在 98% 以上; AAG (Sigma 公司, G9885-25MG, 99%), HSA 水溶液 (电泳纯, 武汉生物制品研究所), 色谱纯甲醇, TE 储备液 (0.4 mmol/L 的 50% 乙醇液), HSA 储备液 (3 mmol/L 水溶液), AAG 储备液 (0.1 mmol/L 水溶液)。

2 方法与结果

2.1 样品的制备: 称取 TE 对照品 1.85 mg 置于 10 mL 量瓶内, 加入 5 mL 乙醇和 5 mL 水, 适当超声助溶配成 0.4 mmol/L 的 50% 乙醇液储备液。另在无菌工作台下取适量 AAG 和水配成 0.1 mmol/L AAG 水溶液, HSA 液适当稀释成 3 mmol/L 水溶液供储备液使用。分别取不同量 TE 储备液置于 Ep 管中, 于氮气吹干仪上吹干, 每管加入 pH 6.8 10 mmol/L 乙酸铵缓冲液 450 μ L, 再加入 50 μ L 0.030 mmol/L HSA (或 50 μ L 0.050 mmol/L AAG), 配制不同量比的 TE/HSA (或 TE/AAG) 混合液, 在微型旋涡混合仪上充分混合后于 37 $^{\circ}$ C 作用 60 min, 最后用 pH 6.8 10 mmol/L 乙酸铵缓冲液稀释 10 倍后经自动进样器进质谱分析。

2.2 质谱条件: ESI 离子源; 扫描范围 m/z 500~2 000; 离子源喷射电压 5.0 kV; 毛细管温度 190 $^{\circ}$ C (HSA-TE), 185 $^{\circ}$ C (AAG-TE); Cone 电压 35 V; 鞘气 (N_2) 流量 0.60 L/min。流动相分别为甲醇-水 (1:1) (对 HSA 和 AAG)、100% 甲醇 (对 TE)、10 mmol/L 乙酸铵 (对 TE-HSA 和 TE-AAG), 进样量 10 μ L, 体积流量 0.2 mL/min; 自动进样, 一级正

离子全扫描 10 min。

2.3 TE、HSA 和 AAG 相对分子质量的测定: 根据 TE 的一级正离子全扫描质谱, 测得 TE 的相对分子质量为 461.9, 与 TE 的理论相对分子质量 462.4 基本相符。HSA 和 AAG 一级正离子全扫描质谱图见图 1, 经 Xcalibur 软件分析测得的 HSA 和 AAG 的平均相对分子质量分别为 66 428 和 44 106, 与 HSA 和 AAG 的理论相对分子质量 66 438 和 44 100 基本相符。

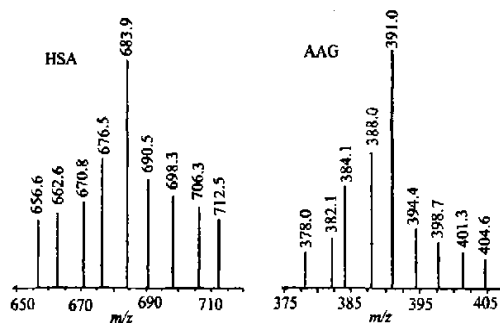


图1 1.0×10^{-5} mol/L HSA 和 AAG 一级正离子质谱图

Fig. 1 ESI-MS Spectra of 1.0×10^{-5} mol/L HSA and AAG

2.4 实验条件对复合物形成的影响: 采用 ESI-MS 技术研究非共价结合大分子复合物, 既要保证分析液去溶剂化完全便于质谱分析, 又要保证非共价复合物的结构不被破坏^[6]。因此, 实验选取射干苷与 HSA、AAG 浓度比分别为 240:3、280:3 时的反应液, 以复合物相对分子质量指标, 考察了作用液 pH 值、毛细管温度和锥孔电压对蛋白药物复合物形成的影响, 见表 1。

考察 pH 影响时, TE-HSA 选用 T_{cap} 190 $^{\circ}$ C、

表 1 不同 pH 条件下药物蛋白复合物的相对分子质量

Table 1 Molecular weight of drug-protein complexes in different pH values

pH 值	相对分子质量		$T_{cap}/^{\circ}$ C	TE-HSA		$T_{cap}/^{\circ}$ C	TE-AAG	V_{cone}/V	相对分子质量	
	TE-HSA	TE-AAG		相对分子质量	相对分子质量		相对分子质量		TE-HSA	TE-AAG
5.6	67 031	44 613	180	67 133	175	44 664	25		66 792	44 757
6.2	67 390	44 962	185	67 385	180	44 886	30		67 175	44 827
6.8	67 449	44 987	190	67 449	185	44 987	35		67 449	44 987
7.3	67 254	44 862	195	67 357	190	44 863	40		67 138	44 855
8.0	66 828	44 577	200	66 883	195	44 788	45v		66 618	44 766

V_{cone} 35 V, TE-AAG 选用 T_{cap} 185 $^{\circ}$ C、 V_{cone} 35 V; 考察 T_{cap} 影响时, 选用 pH 6.8、 V_{cone} 35 V; 考察 V_{cone} 影响时, TE-HSA 选用 T_{cap} 190 $^{\circ}$ C、pH 6.8, TE-AAG 选用 T_{cap} 185 $^{\circ}$ C、pH 6.8。结果表明, 在生理 pH 条件下血浆蛋白结合的 TE 较多, pH 值、毛细管温度、锥孔电压的改变对 TE 与血浆蛋白的结合均有不同程度的影响。当毛细管温度过高或

锥孔电压过大时能导致复合物解离, 而过低的毛细管温度或锥孔电压又会影影响复合物的电离。因此 TE-HSA 和 TE-AAG 复合物较为理想的分析条件分别为 pH 6.8、毛细管温度 190 $^{\circ}$ C、锥孔电压 35 V 和 pH 6.8、毛细管温度 185 $^{\circ}$ C、锥孔电压 35 V。

2.5 复合物的结合特性

2.5.1 复合物表观结合化学计量比: 通过分别测定

不同浓度的 TE 与固定浓度 HSA、AAG 作用后复合物的相对分子质量的变化,计算 TE 与 HSA、AAG 的化学结合的表观计量比 $N[N=(M_{\text{复合物}}-M_{\text{蛋白}})/M_{\text{药物}}]$,式中 M 代表分析物相对分子质量],见图 2。

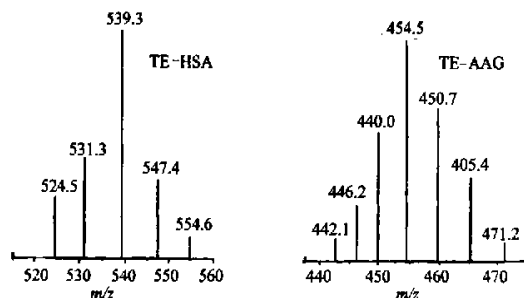


图 2 TE 与 HSA 和 AAG 物质的量比分别为 3 : 400 和 1 : 360 形成的复合物的一级质谱图

Fig. 2 ESI-MS Spectra of 3 : 400 TE-HSA and 1 : 360 TE-AAG molar ratio

2.5.2 复合物作用力类型分析:判断生物大分子与小分子结合性质的热力学规律,即: $\Delta S > 0$ 为疏水和静电作用力, $\Delta S < 0$ 为氢键和范德华力, $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$ 为典型的疏水作用力, $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S < 0$ 为氢键和范德华力, $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S > 0$ 为静电作用力^[7]。因此,可以通过改变质谱毛细管温度,计算温度变化时药物蛋白结合的 ΔH 、 ΔS 。

$$\ln K_2/K_1 = \Delta H(1/T_1 - 1/T_2)/R$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K$$

式中 T_1 、 T_2 分别为 185 °C、195 °C (对 TE-HSA) 和 180 °C、190 °C (对 TE-AAG) 的绝对温度, K_1 、 K_2 为与之对应的结合常数。

通过计算,在 185 °C 和 195 °C 的不同毛细管温度作用下,TE 与两种血浆蛋白结合的稳定常数 K 值分别为 TE-HSA: 1.814×10^4 、 1.743×10^4 , TE-AAG: 4.380×10^4 和 4.124×10^4 。根据绝对温度值和对应的稳定常数分别计算出 TE-HSA 和 TE-AAG 复合物在上述温度变化时的 ΔH 和 ΔS 值。TE-HSA: $\Delta H = -7.118$ kJ, $\Delta S = 65.952$ J/mol · K; TE-AAG: $\Delta H = -10.506$ kJ, $\Delta S = 65.630$ J/mol · K。可见,TE 与 HSA 和 AAG 之间的作用力都主要为静电引力。

2.6 复合物稳定性分析:药物与血清中蛋白质分子存在非共价键作用,这种作用多采用位点结合模型解释,这是一种纯经验模型。在这种模型下蛋白质分子存在多类结合位点且各类结合作用是等同和独立的,可采用多级结合方程来说明^[8,9]。

$$r = C_b/[P] = \sum_{i=1}^m n_i K_i C_i / (1 + K_i C_i)$$

式中 C_b 、 C_i 分别为药物的结合浓度和游离浓度, $[P]$ 为结合蛋白质浓度, r 是药物与蛋白结合的化学计量比, m 表示蛋白质共有 m 类结合位点, n_i 、 K_i 分别表示一个蛋白质分子上第 i 类结合位点的位点数目和结合常数。

这个方程从形式上来说类似于 Langmuir 吸附方程,当蛋白质分子仅有一类结合位点时,此方程可转化为 Scatchard 方程^[10]。

$$r/C_i = nK - K_r$$

式中 r 为药物与蛋白的结合比即化学计量比, C_i 为游离药物浓度 ($C_i = C_L - r[P]$), C_L 是药物总浓度, K 为结合常数, n 为结合位点数。

实验固定 HSA 和 AAG 作用浓度不变,用不同浓度 TE 与之作用并测定复合物相对分子质量。依据相对分子质量的变化求得其不同浓度条件时的化学计量比,再根据 Scatchard 方程对 r/C_i 与 r 进行线性拟合,见图 3。由该曲线的斜率和截距可计算出 TE 与 HAS、AAG 形成复合物的稳定常数(K)和结合位点数(n)分别为 1.914×10^4 mol/L, $n = 7.8$ 和 5.893×10^4 mol/L, $n = 3.3$ 。

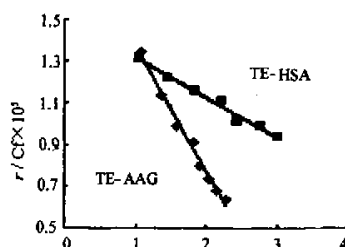


图 3 TE 与 HSA、AAG 结合的 Scatchard 曲线

Fig. 3 Scatchard plot for binding TE to HSA and AAG

3 讨论

采用 ESI-MS 研究小分子与蛋白质的作用主要是基于当作用的小分子药物量相对作用的蛋白过量时,蛋白复合物总浓度与作用的蛋白总浓度近似相等,当药物对蛋白的过量程度较小或较大时,Scatchard 滴定分析曲线不呈线性,只有当作用浓度比合适时,Scatchard 滴定分析曲线才呈线性。本实验经过优化实验条件以尽可能排除非特异结合,通过对 HSA、AAG 与 TE 结合的 ESI-MS 研究,得到了稳定常数、结合常数和主要作用力类型等值,但该方法可能不适用于亲和力较弱的体系,这是因为如果蛋白与小分子配体间亲和力太弱而配体相对作用蛋白大大过量时,蛋白与配体间的非特异性结合会影响方法的测定结果,因此采用 ESI-MS 技术研究蛋白与小分子的非共价结合作用在亲和力较强的体

系具有较强的适用性。

References:

- [1] Guo B, Li C. Progress in research and evaluation on drug-plasma protein binding in pharmacology [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学) 2005, 10(3): 241-253.
- [2] Frank S, Carol V R. Characterising electrosprayed biomolecules using tandem-MS the non-covalent GroEL chaperonin assembly [J]. *Int J Mass Spectr*, 2004, 236: 25-32.
- [3] Griffey R H, Sannes-Lowery K A, Drader J J, et al. Characterization of low-affinity complexes between RNA and small molecules using electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 9933-9938.
- [4] Wei H G, Gregory G P, Ingrid F, et al. A mass spectrometric study of noncovalent gas phase interaction of staphylococcal nucleases with 5'-nucleoside phosphate inhibitors [J]. *Int J Mass Spectr*, 2003, 222: 397-412.
- [5] Michael P, Udo H V, Paul K. Features of the ESI mechanism that affect the observation of multiply charged noncovalent protein complexes and the determination of the association constant by the Titration method [J]. *Biol Mass Spectr*, 2004, 15: 1424-1434.
- [6] Jurg M D, Gregor M, Silke W, et al. Mass spectrometric determination of association constants of adenylate kinase with two noncovalent inhibitors Renato [J]. *J Am Soc Mass Spectr*, 2003, 14: 442-448.
- [7] Sarkar B. *Metal Ions In Biological System* [M]. New York: Marcel Dekker, 1991.
- [8] Wang H L, Zou H F, Zhang Y K. Studies on the competition coordination between drug and protein by microdialysis-LC [J]. *Sci China: Series B* (中国科学B辑), 1998, 28(1): 71-77.
- [9] Liang W Q. *Biopharmaceutics and Pharmacokinetics* (生物药剂学与药物动力学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003.
- [10] Scatchard G, Scheinberg I H, Armstrong S H. Physical chemistry of protein solutions. The combination of human serum albumin with chloride ion [J]. *J Am Chem Soc*, 1950, 72: 535-540.

盐酸小檗碱纳米乳的制备及其理化性质研究

孙红武^{1,2}, 欧阳五庆^{1*}

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌, 712100; 2. 第三军医大学药学院微生物及免疫学教研室, 重庆 400038)

摘要:目的 制备出盐酸小檗碱纳米乳并对其理化性质进行研究。方法 选择油相肉豆蔻酸异丙酯、表面活性剂聚氧乙烯蓖麻油和助表面活性剂甘油, 利用伪三元相图制备出盐酸小檗碱纳米乳。用 13 000 r/min, 30 min 离心稳定性和粒径为纳米乳的评价指标, 采用 HPLC 测定纳米乳中盐酸小檗碱的量, 同时对纳米乳的黏度、电导率、折光率、Zeta 电位、粒径的基本理化性质和高湿(92.5%)、高温(40℃, 60℃)、25℃及强光[(4 500±500)lx]的条件下的稳定性进行研究。结果 制备出的盐酸小檗碱纳米乳为澄清透明的液体, 透射电镜下观察为球状液滴, 平均粒径为 56.8 nm; 离心稳定, 在上述高湿、高温、强光条件下考察 10 d, 其含量和粒径均未发生明显变化。结论 盐酸小檗碱纳米乳是一种质量稳定的良好药物传递系统。

关键词:盐酸小檗碱; 纳米乳; 理化性质; 稳定性

中图分类号: R283.1; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)10-1476-05

Preparation and physicochemical characteristics of berberine hydrochloric nanoemulsion

SUN Hong-wu^{1,2}, OUYANG Wu-qing¹

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest University of A & F Science and Technology,

Yangling 712100, China; 2. Department of Clinical Microbiology and Immunology, College of Pharmacy,

Third Military Medical University of PLA, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To prepare berberine hydrochloric nanoemulsion and study its physicochemical characteristics of nanoemulsion. **Methods** The nanoemulsion components of isopropyl myristate (IPM), EL40, and glycerin were selected. Berberine hydrochloric nanoemulsion was prepared with pseudoternary phase diagrams. Taking centrifuge tests (13 000 r/min, 30 min) and the average diameter as evaluation indexes of nanoemulsion, the content of berberine hydrochloric in nanoemulsion was determined through HPLC. The basic physicochemical characteristics including viscosity, electric conductivity, refraction, zeta-potential, and particle diameter were studied. And also the stability of nanoemulsion was studied under the conditions of high humid (92.5%), high temperature (40℃ and 60℃), and strong light [(4 500±500) lx]. **Results** Prepared nanoemulsion was a kind of clarity and transparent solution and it presented as small spherical drops under electron microscopy, with the average diameter of about 56.8 nm. Its na-

收稿日期: 2006-12-19

基金项目: 西北农林科技大学校长基金资助项目(130709)

作者简介: 孙红武(1977-), 男, 重庆垫江人, 博士, 2001年毕业于西南大学药学院, 2007年获西北农林科技大学博士学位, 现从事纳米药物制剂的开发。E-mail: sunhongwu2001@163.com

* 通讯作者 欧阳五庆 E-mail: oywq506@sina.com