

脂复合物后,可改善药物的溶解性,本实验结果表明淫羊藿苷元磷脂复合物,更大程度地提高了药物的水溶性。将淫羊藿苷元制成磷脂复合物后药物在水中的平衡溶解度提高了 5.9 倍,在正辛醇中的平衡溶解度提高了 1.6 倍。

淫羊藿苷元为一种难溶性化合物,本实验曾采用水,人工胃液、人工肠液及它们的表面活性剂溶液做为释放介质,结果表明药物在这些介质中只能以混悬液的形式存在,释放的药物不能被接受介质充分溶解,表明药物在上述释放介质不能达到漏槽条件,而在体内溶解的药物会不断地被带走,不断地被吸收,因此所选择的溶出介质应模拟体内的漏槽状态。为达到溶出所需要的漏槽状态,本实验采用了含 30% 乙醇的 pH 6.8 的 PBS 溶液作为释放介质。

将淫羊藿苷元磷脂复合物与 PVP 制成共沉淀物,既可降低黏性增加物料的流动性,以利于剂量的准确性,又可加速药物的溶出。淫羊藿苷元磷脂复合物是淫羊藿苷元与磷脂之间以弱键作用形成的一种复合物,实验曾将淫羊藿苷元磷脂复合物用无水乙醇复溶,减压回收无水乙醇后所得固体经 IR、

DSC、PNMR 鉴定,产物仍为复合物,表明乙醇不会破坏淫羊藿苷元与磷脂之间的弱键作用,但高分子材料 PVP 可能会破坏药物与磷脂之间的这种弱键作用,因此,形成共沉淀后,淫羊藿苷元与磷脂之间是否以复合物的形式存在,有待进一步确认。制备淫羊藿苷元磷脂复合物旨在增加药物的渗透性,以提高其生物利用度,而制备淫羊藿苷元磷脂复合物与 PVP 共沉淀物目的是为增加复合物的溶出,因此复合物及其共沉淀物的渗透性差异有待进一步研究,以确认制备共沉淀物的合理性。

参考文献:

- [1] Huang J, Yuan L, Wang X, *et al.* Icaritin and its glycosides enhance osteoblastic, but suppress osteoclastic, differentiation and activity *in vitro* [J]. *Life Sci*, 2007, 81(10): 832-840
- [2] 凌沛学, 汤 漩, 王凤山, 等. 药物与磷脂复合物研究近况[J]. *中国药学杂志*, 2005, 40(6): 401-402
- [3] 熊 阳, 盛卫国, 徐莲英, 等. 山楂叶总黄酮磷脂复合物的研究 [J]. *中草药*, 2008, 39(3): 353-356
- [4] 张婷婷, 徐 文, 胡生亮, 等. 水飞蓟宾在不同介质中平衡溶解度和表观油水分配系数的测定 [J]. *中国药学杂志*, 2006, 41(20): 1569-1571
- [5] 李 颖, 潘卫三, 陈士林, 等. 葛根素磷脂复合物的制备及其固体分散体研究 [J]. *中国药学杂志*, 2006, 41(15): 1162-1167

荧光猝灭法研究马钱子碱、土的宁与人血清白蛋白的相互作用

童 俊, 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 研究马钱子碱、土的宁与人血清白蛋白(HSA)间非共价结合特性。方法 采用荧光猝灭法计算药物与蛋白间的结合常数与结合位点数;根据不同作用温度时药物-蛋白非共价结合复合物的热力学参数变化,分析药物与蛋白间的主要作用力类型。结果 当作用温度分别为 25℃和 35℃时,马钱子碱与 HSA 的结合常数(K)分别为 2.12×10^4 L/mol 和 1.97×10^4 L/mol,结合位点数(n)分别为 1.07 和 1.07;土的宁与 HSA 的 K 分别为 6.34×10^3 L/mol 和 3.05×10^3 L/mol, n 分别为 1.01、0.97。马钱子碱、土的宁与 HSA 间的作用力主要为氢键和范德华力。结论 马钱子碱、土的宁与 HSA 能自发形成不发荧光的复合物,这种药物-蛋白结合可能对马钱子碱、土的宁的药动学过程产生一定影响。

关键词: 马钱子碱; 土的宁; 人血清白蛋白; 荧光猝灭

中图分类号: R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)09-1453-04

Interactions between brucine, strychnine and human serum albumin by using fluorescence quenching method

TONG Jun, HAN Feng-mei, CHEN Yong

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

Abstract: Objective To investigate the effects of both brucine and strychnine on human serum albumin (HSA). **Methods** The binding constant K and the binding sites value (n) between drug and protein

* 收稿日期: 2010-03-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30630075)

作者简介: 童 俊(1986-),女,湖北钟祥人,湖北大学生命科学学院在读研究生,研究方向为药动学。

Tel: 13036160724 E-mail: tj196318@163.com

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

were gotten by fluorescence quenching method: and depending on the changes of thermodynamic parameters about the drug-protein complex under different temperatures, the main binding forces could be obtained between these two medicines and HSA. **Results** When the temperatures were 25 °C and 35 °C, the binding constant K between brucine and HSA were 2.12×10^4 and 1.97×10^4 L/mol with the binding sites value (n) of 1.07 and 1.07, respectively. To strychnine and HSA, the binding constant K at different temperatures were 6.34×10^3 and 3.05×10^3 L/mol. The n were 1.01 and 0.97. **Conclusion** Brucine, strychnine and HSA can be combined compound which have no fluorescence, and the drug-protein binding may have some impact on the pharmacokinetics of brucine and strychnine.

Key words: brucine; strychnine; human serum albumin (HSA); fluorescence quenching

血清白蛋白(HSA)是生命体血浆中最丰富的蛋白质,具有贮运内源代谢物和外源小分子药物等重要生理功能,研究 HSA 与药物的结合作用对阐明药物动力学及药效学有重要意义^[1]。马钱子碱和土的宁是马钱子 *Strychnos nux-vomica* L. 的主要药效与毒性成分,属吲哚类生物碱,具有兴奋中枢神经的作用,临床上主要用于治疗风寒湿痹、麻木瘫痪、跌打损伤、类风湿关节炎等疾病^[2,3]。但由于其有效剂量与中毒剂量非常接近,临床使用时易发生中毒事件。因此,阐明马钱子碱和土的宁与 HSA 间的结合作用特性对马钱子及其复方的临床安全用药具有十分积极的指导作用。笔者采用液相色谱-质谱法分析了东莨菪碱和山莨菪碱的代谢情况^[4,6],并考察了射干苷与血浆蛋白的结合^[7]。本实验应用荧光猝灭法研究了马钱子碱和土的宁与 HSA 间的非共价结合作用特性。

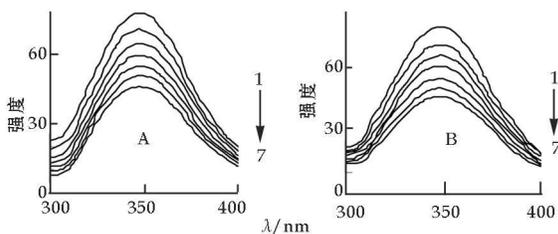
1 仪器和材料

RF-450 型荧光光度计(带恒温装置,日本岛津公司),马钱子碱(Fluka 公司),土的宁(Sigma 公司),人血清白蛋白(HSA,武汉生物制品所提供),pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液,二次重蒸水,其他试剂为国产分析纯;3.0 mmol/L 马钱子碱、土的宁水溶液储备液,10 μmol/L HSA 水溶液储备液。

2 方法与结果

2.1 发射光谱的测定:于 10.0 mL 刻度比色管中依次加入 2.0 mL 0.5 mol/L NaCl 溶液,2.0 mL pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液,2.0 mL 10 μmol/L HSA 储备液,用水定容至 10.0 mL,摇匀并在 37 °C 恒温水浴预热 10 min。取该溶液 3.0 mL 于 4.5 mL 荧光池中,以 286 nm 为激发波长,在 300~400 nm 扫描荧光发射光谱(波长狭缝宽度 10 nm)。用移液枪分别加入 10 μL 不同浓度马钱子碱溶液,摇匀并作用 3 min 后,在上述条件下测量混合液的发射光谱。同上法测定土的宁的荧光发射光谱。

2.2 HSA 的荧光猝灭光谱:选用了 25、35 °C 两个蛋白药物作用温度。在本实验条件下,马钱子碱、土的宁溶液荧光强度很弱,对 HSA 的荧光发射光谱无影响。作用温度为 25 °C 时 HSA 与不同量马钱子碱和土的宁相互作用时的荧光发射光谱图见图 1,其发光特征是由于 HSA 的 214 位色氨酸残基的发光所致^[8]。结果表明,固定 HSA 的作用浓度 2 μmol/L,随着作用药物浓度的不断增加,虽然 HSA 的荧光发射光谱的峰位和峰形不变,但 HSA 的内源荧光强度均呈现有规律的降低,说明它们之间形成了复合物。



A 1-0 2-10 μmol/L 3-20 μmol/L 4-30 μmol/L
5-40 μmol/L 6-50 μmol/L 7-60 μmol/L
B 1-0 2-20 μmol/L 3-40 μmol/L 4-60 μmol/L
5-80 μmol/L 6-100 μmol/L 7-120 μmol/L

图 1 马钱子碱(A)和土的宁(B)对 HSA 荧光发射光谱的影响

Fig 1 Effect of brucine (A) and strychnine (B) on fluorescence emission spectra of HAS

2.3 马钱子碱、土的宁对 HSA 荧光的猝灭机制:引起蛋白荧光猝灭的原因有动态和(或)静态猝灭。动态猝灭是一种电子或能量的转移过程,不影响蛋白质的二级结构和生理活性;静态猝灭通常是生成了不发荧光的配合物,且对蛋白质的二级结构和生理活性有影响。荧光动态猝灭符合 Stern-Volmer 曲线方程^[8]。

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_s [Q] \quad (1)$$

式中, F_0 是猝灭剂不存在时的荧光强度, F 为加入猝灭剂后的荧光强度, K_s (L/mol) 为动态猝灭过程速率常数, 它表示

生物大分子与荧光猝灭剂彼此扩散和碰撞达到动态平衡时的量效关系; K_q ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 为双分子表现猝灭常数, 它反映了体系中分子的彼此扩散和相互碰撞对生物大分子荧光寿命衰减速率的影响。[Q] 为猝灭剂浓度。 τ_0 为猝灭剂不存在时荧光分子的平均寿命(约为 1×10^{-8} s)

根据(1)式, 把 F_0/F 分别对所加入的马钱子碱、土的宁的总浓度[Q]作图, 得到它们对 HSA 荧光的 Stern Volmer 猝灭曲线, 见图 2。

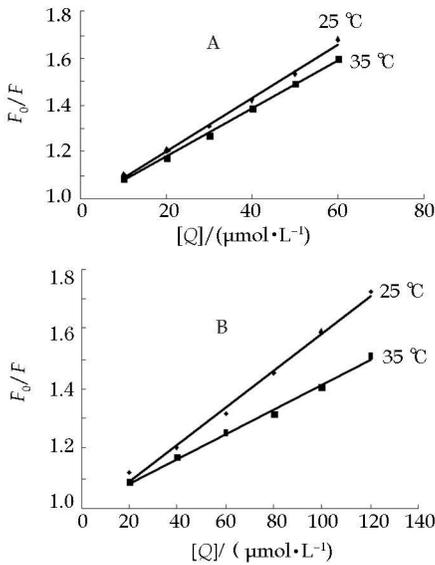


图 2 马钱子碱(A)和土的宁(B)对 HSA 荧光猝灭 Stern Volmer 图

Fig 2 Stern Volmer curves of fluorescence quenching HSA by brucine (A) and strychnine (B)

可见 F_0/F 随马钱子碱、土的宁浓度[Q]的增加呈线性增大。通过计算可知, 作用温度为 25、35 °C 时, 马钱子碱的荧光猝灭 K_{sv} 分别为 11 480、10 310 L/mol, 土的宁的荧光猝灭 K_{sv} 分别为 6 130、4 140 L/mol。由于生物大分子的最大动态 $K_{sv} < 100$ L/mol^[9], 而通过 Stern Volmer 曲线方程求得的 HSA 分别与马钱子碱和土的宁非共价结合的猝灭过程速率常数比最大动态猝灭过程速率常数大几个数量级, 说明马钱子碱和土的宁对 HSA 内源性荧光的猝灭过程不是由扩散控的动态猝灭过程, 而可能是静态猝灭过程。另外, 动态猝灭和静态猝灭可依据不同温度条件下的结果加以区别。对于动态猝灭, 温度的升高将增加有效碰撞和加剧电子转移过程, 使猝灭常数随温度的升高而增大; 若是静态猝灭, 温度的升高将降低配合物的稳定性, 使猝灭常数减小^[10]。马钱子碱、土的宁的荧光猝灭 K_{sv} 随着温度的升高而降低, 说明动态碰撞不是马钱子碱、土的宁引起 HSA 荧光猝灭的主要原因。

2 4 荧光给体-受体间平衡常数和结合位点数: 对于静态猝灭过程, 荧光强度与猝灭剂的关系可由荧光分子与猝灭剂分子间的结合常数表达式推导求出。设生物大分子有 n 个相同且独立的结合位点, 则其与小分子间的猝灭反应可表示为^[11]: $n[Q] + B \rightleftharpoons Q_nB$, 结合常数 K 可表示为:

$$K = [Q_nB] / [Q]^n [B] \quad (2)$$

式中[B]是游离荧光体浓度, [Q]是猝灭剂浓度, $[Q_nB]$ 是配合物浓度。

若荧光体总浓度为[B₀], 则 $[B_0] = [Q_nB] + [B]$, 当 $[Q] \geq [B_0]$ 时, 可以猝灭剂的起始浓度代替其平衡浓度, 则:

$$K = ([B_0] - [B]) / [Q]^n [B] \quad (3)$$

$$[B] / [B_0] = F / F_0 \quad (4)$$

在静态猝灭中, 体系的荧光强度 F 与其游离浓度成正比(所生成的配合物是非荧光性的)。

由(3)和(4)式得

$$\lg[(F_0 - F) / F] = \lg K + n \lg [Q] \quad (5)$$

根据(5)式处理图 2 数据作图 3, 得到线性回归方程:

作用温度为 25 °C 时, $\lg[(F_0 - F) / F] = 1.067 5 \lg [Q] + 4.327 1, r^2 = 0.999 2$ (6)

作用温度为 35 °C 时, $\lg[(F_0 - F) / F] = 1.071 4 \lg [Q] + 4.295 1, r^2 = 0.998 7$ (7)

根据(6)和(7)式可计算出作用温度为 25、35 °C 时, 马钱子碱与 HSA 的结合常数(K)和结合位点数(n)分别为 2.12×10^4 L/mol、1.07 和 1.97×10^4 L/mol、1.07。根据(5)式处理图 2 数据作图 3, 得到线性回归方程:

作用温度为 25 °C 时, $\lg[(F_0 - F) / F] = 1.011 2 \lg [Q] + 3.802 3, r^2 = 0.990 8$ (8)

作用温度为 35 °C 时, $\lg[(F_0 - F) / F] = 0.967 5 \lg [Q] + 3.483 6, r^2 = 0.997 2$ (9)

根据(8)和(9)式可计算出作用温度为 25、35 °C 时, 土的宁与 HSA 的结合常数 K 和结合位点数 n 分别为 6.34×10^3 L/mol、1.01 和 3.05×10^3 L/mol、0.97。

2 5 荧光给体-受体间作用力的确定: 有机小分子与蛋白质相互结合的主要部位是蛋白质上的碱性氨基酸残基, 如精氨酸、赖氨酸、组氨酸残基和 N 端氨基等。相互作用力有氢键作用力、静电作用力、疏水作用和范德华力等。Otagiri 总结出判断生物大分子与小分子结合性质的热力学规律^[12], 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。通过改

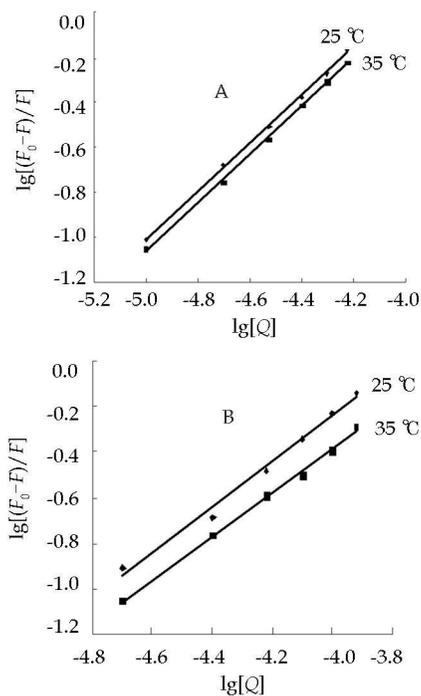


图 3 不同温度下马钱子碱(A)和土的宁(B)对 HSA 荧光猝灭作用的双对数图

Fig 3 Double lg plot of brucine (A) and strychnine (B) quenching effect on HSA fluorescence at different temperatures

变反应作用温度, 经 (10) 和 (11) 式:

$$\ln K_2 / K_1 = \Delta H (1/T_1 - 1/T_2) / R \quad (10)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S = -RT \ln K \quad (11)$$

可计算温度变化时药物蛋白结合的 ΔH 和 ΔS 。式中, T_1 和 T_2 分别为 25 °C 和 35 °C 的绝对温度, K_1 和 K_2 为与之对应的结合常数。对于马钱子碱计算结果为: $\Delta H = -5.63015 \text{ J/mol}$, $\Delta S = -1.91 \times 10^4 \text{ J/(mol} \cdot \text{K)}$; 土的宁计算结果为: $\Delta H = -5.60 \times 10^5 \text{ J/mol}$, $\Delta S = -115.20 \text{ J/(mol} \cdot \text{K)}$ 。可见马钱子碱和土的宁与 HSA 之间的作用力主要为氢键和范德华力。从热力学角度来看, 在一定温度和压力下, 药物与蛋白的结合反应能否自发进行取决于 ΔG , $\Delta G < 0$ 时有利于反应自发进行。马钱子碱、土的宁与 HSA 结合反应的 ΔG 分别

为 -24685.33 、 -21696.4 J/mol , 因此马钱子碱和土的宁与 HSA 之间的结合反应是自发进行的。

3 讨论

HSA 中由于色氨酸、酪氨酸等氨基酸残基的存在而具有内源荧光, 马钱子碱和土的宁本身在扫描范围内无荧光, 但在与 HSA 相互作用的过程中能不同程度地猝灭 HSA 的荧光。研究表明, 马钱子碱和土的宁对 HSA 的荧光猝灭机制均属于静态猝灭, 即马钱子碱和土的宁与 HSA 之间自发形成不发荧光复合物时, 出现了无辐射能量转移, 产生了荧光体的静态猝灭, 且它们之间的作用力主要为氢键和范德华力。

参考文献:

- [1] 王春, 吴秋华, 王志, 等. 马钱子碱与牛血清白蛋白相互作用的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(4): 754-757.
- [2] 阴健. 中药现代研究与临床应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1993: 118.
- [3] 唐得时. 中药化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988.
- [4] 陈怀侠, 杜鹏, 韩凤梅, 等. 东莨菪碱及其大鼠肝匀浆代谢物的液相色谱-质谱法分析[J]. 中草药, 2009, 40(5): 719-721.
- [5] 马小红, 王新立, 陈勇, 等. 高效液相色谱串联电喷雾质谱法测定大鼠血浆中山莨菪碱[J]. 中草药, 2008, 39(9): 1312-1315.
- [6] 陈怀侠, 杜鹏, 韩凤梅, 等. 山莨菪碱及其大鼠肠内菌体外代谢物的液相色谱-质谱法分析[J]. 中草药, 2009, 40(4): 563-565.
- [7] 曹焱, 韩凤梅, 陈勇. 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[J]. 中草药, 2007, 38(10): 1473-1476.
- [8] 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等. 荧光分析法[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1990.
- [9] Ware W R. Oxygen quenching of fluorescence in solution: an experimental study of the diffusion process [J]. *J Phys Chem Phys Chem*, 1962, 66: 455-458.
- [10] 赵锦, 王志, 吴秋华, 等. 应用荧光光谱法和紫外光谱法研究土的宁与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 药学学报, 2006, 41(7): 667.
- [11] Alain M, Michel B, Michel D. How to illustrate ligand protein binding in a class experiment: an elementary fluorescent assay [J]. *J Chem Educ*, 1986, 63(4): 365-366.
- [12] Otagiri M. Interactive binding to the two principal ligand binding sites of human serum albumin: effect of the neutral to base transition [J]. *Bioch Biophys Acta*, 1999, 1432: 313-323.