

• 研究论文 •

罗布麻活性成分与人血清白蛋白结合的光谱学研究

苏忠^{a,b} 秦川^a 谢孟峡^{*,a} 李建东^b 王英典^a

(^a北京师范大学分析测试中心 北京 100875)

(^b东北师范大学草地科学研究所 长春 130024)

摘要 应用荧光和紫外光谱研究了人血清白蛋白与罗布麻活性成分槲皮素(QUE)、芸香苷(RUT)和儿茶素(CAT)的结合机理. 在 QUE 与蛋白质浓度比小于 3.5 时, 其荧光猝灭机理主要是静态猝灭, 在药物浓度较高时动态猝灭所占的比例增加; RUT 在整个实验浓度范围内对蛋白质的荧光猝灭机理为静态猝灭; CAT 与蛋白质之间不能形成复合物, 其荧光猝灭主要由动态猝灭产生. QUE 和 RUT 分别与蛋白质形成 1:1 的复合物, 结合常数分别为 $(1.51 \pm 0.13) \times 10^5$ 和 $(0.81 \pm 0.08) \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. 由于激发态质子转移, 与蛋白质的相互作用引起 QUE 和 RUT 内源荧光发射峰强度的明显增加, 进一步证实了它们与蛋白质的结合. 与蛋白质的结合也引起了 QUE 紫外吸收带的明显红移, 说明药物分子中的酚羟基发生了解离, 以离子形式与蛋白质发生作用. RUT 的紫外吸收谱带没有明显移动, 说明它主要以中性状态与蛋白质结合. 应用与蛋白质作用后药物分子紫外吸收光谱的二阶导数谱, 对药物与蛋白质的结合模式进行了深入探讨.

关键词 罗布麻活性成分; 荧光光谱; 紫外光谱; 二阶导数谱

Spectroscopic Investigation of the Binding of the Active Components of *Apocynum venetum* L. to Human Serum Albumin

SU, Zhong^{a,b} QIN, Chuan^a XIE, Meng-Xia^{*,a} LI, Jian-Dong^b WANG, Ying-Dian^a

(^a Analytical & Testing Center of Beijing Normal University, Beijing 100875)

(^b Institute of Grassland Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024)

Abstract Quercetin (QUE), rutin (RUT) and catechin (CAT) are main active components of *Apocynum venetum* L. The binding mechanisms of these active components to human serum albumin (HSA) have been investigated utilizing fluorescence and UV absorption spectra. The results revealed that the fluorescence quenching arose mainly from static quenching by complex formation when the $c_{\text{QUE}}/c_{\text{HSA}} \leq 3.5$, and the proportion of dynamic quenching increased in higher drug concentration; while the quenching mechanism was mainly static in the drug concentration range studied for RUT. However, CAT cannot form complex with HSA. The binding site number was one for QUE and RUT, and the binding constants were $(1.51 \pm 0.13) \times 10^5$ and $(0.81 \pm 0.08) \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectively. The intrinsic fluorescence of QUE and RUT conspicuously enhanced in the presence of HSA due to excited-state proton transfer (ESPT) and it further confirmed the complex formation of HSA with QUE and RUT, individually. The UV absorption bands of QUE significantly red-shifted after interacting with HSA, which signified that the phenol group dissociated during the QUE-protein binding process and the binding was driven by electrostatic force. However, the combination of RUT and HSA did not induce obvious red shift of UV absorption bands of RUT, and their binding force originated probably from the hydrogen bonding between RUT and HSA. Based on the second derivative UV absorption spectra, the binding modes of QUE and RUT were discussed.

* E-mail: xiemx@bnu.edu.cn; mengxia-xie@263.net; Tel.: 010-58807981; Fax: 010-58800076.

Received August 29, 2006; revised September 28, 2006; accepted October 24, 2006.

国家自然科学基金(No. 30470180)和新医药学科群(No. XK100270569)、放射性药物教育部重点实验室开放基金资助项目.

Keywords active components of *Apocynum venetum* L.; fluorescence spectra; UV absorption spectra; second derivative spectra

罗布麻(*Apocynum venetum* L.)为夹竹桃科多年生草本植物,主要分布于我国的西北、东北和黄河流域,是一种喜生于盐碱、沙漠地的野生植物,含有黄酮类、酚酸类、强心甙等多种药用成分^[1,2].在不同产地的罗布麻叶中,黄酮类化合物的质量分数在1%~2%左右^[3,4],其中,槲皮素(quercetin, QUE)、芸香苷(rutin, RUT)、儿茶素(catechin, CAT)(结构见图1)和它们的衍生物为主要活性成分^[5].近年来,国内外对罗布麻叶提取物的药理药效进行了大量的研究,由于含有多种植物多酚类药物活性成分,其提取物具有多种药理活性,如清除自由基^[6]、预防动脉硬化^[7]、扩张血管^[8],对各种类型的高血压有一定的预防和治疗作用^[9,10];罗布麻叶的提取物还具有抑制低密度酯蛋白^[11]、保肝^[12]等功效,对于精神疾病、抑郁症等也有一定的治疗效果^[13~15].

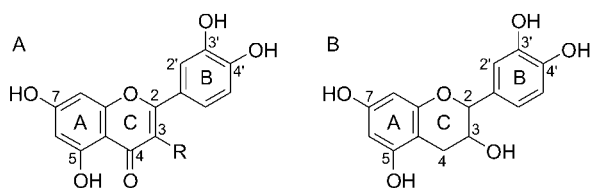


图1 罗布麻叶主要活性成分的结构

A: R=OH, 槲皮素; R=芸香糖, 芸香苷; B: 儿茶素

Figure 1 Chemical structure of main active ingredients of *Apocynum venetum* L.

A, R=OH (quercetin); R=rutinoside (rutin); B: catechin

药物分子一般是通过调节蛋白质的结构而发挥药理药效的^[16],药物分子的结构与其活性和功能密切相关^[17],因此研究药物分子与蛋白质的结合机理有利于深入了解药物的药理药效.人血清白蛋白是血液中的主要蛋白之一,起着储存和运输药物及其它内源和外源性物质的作用,常作为研究药物与蛋白质相互作用的模型蛋白^[18,19].研究发现,99.4%的槲皮素在血液中与血清白蛋白发生结合^[20],平衡透析、圆二色光谱、荧光偏振光谱^[20~22]等多种方法用于研究它们之间的相互作用机理.

本工作应用荧光和紫外光谱探讨了罗布麻叶提取物中的主要药物活性成分(QUE, RUT和CAT)与人血清白蛋白的作用机理.通过荧光猝灭实验,发现药物与蛋白质之间形成了复合物,计算了药物在蛋白质上的结合位点数和结合常数.蛋白质对药物荧光发射的显著增强效应(激发态质子转移引起)进一步证实了药物与蛋白质的特征结合.研究了药物分子在不同pH值条件下的解

离状况,通过药物分子与蛋白质作用后紫外吸收光谱的红移及其二阶导数谱,探讨了它们之间的结合机理.

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

Fluorolog-TAU-3 荧光光谱仪(法国 JY 公司). Cintra-10e UV-Vis 型紫外-可见分光光度计(澳大利亚 GBC 公司). 人血清白蛋白(HSA, 99%), 槲皮素(quercetin, QUE, 99%), 芸香苷(Rutin, RUT, 98%), 儿茶素(Catechin, CAT, 99%)购自美国 Sigma 公司;其它化学试剂均为分析纯;实验用水为 Milli-Q 超纯水.

1.2 溶液配制

准确称量 QUE, RUT, CAT 和 HSA, 药物分别用一定体积的甲醇溶解,再用 $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 值根据实验要求)定容, HSA 直接用 $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液定容,作为母液.将一定体积的药物溶液和蛋白质溶液混合后用 $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液定容(定容后甲醇的体积比小于1%),配制一系列不同浓度比药物和蛋白质的混合溶液.

1.3 荧光光谱

分别以 295 和 280 nm 为激发波长,在 315~520 和 300~520 nm 范围内,测定 HSA 与不同浓度药物混合溶液(pH 7.4)的荧光发射光谱,以相应浓度的药物溶液为参比.蛋白质的终浓度为 $5 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c_{\text{drug}}/c_{\text{HSA}}$ 依次为 0, 0.01, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 10.0.

测定 QUE 和 RUT 的荧光增强效应:激发波长分别是 370 和 367 nm,收集不同浓度的 HSA 存在下药物在 380~600 nm 范围的荧光发射谱,以相应浓度的蛋白质溶液作参比溶液.药物浓度为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c_{\text{HSA}}/c_{\text{drug}}$ 分别为 0.5, 1.0, 2.0, 3.0.

1.4 紫外光谱测量

在 190~520 nm 波长范围内收集不同 pH 值下药物的紫外光谱,以相应的溶剂为参比溶液.药物浓度为 $5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,分别用甲醇和 $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 6.4, 6.9, 7.4, 8.4, 9.0)配制.

在 190~500 nm 范围内记录不同浓度药物与蛋白质混合溶液的紫外光谱,用相应的空白样品溶液作参比.蛋白浓度为 $2 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c_{\text{drug}}/c_{\text{HSA}}$ 分别为 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0.

2 结果与讨论

2.1 罗布麻活性成分对人血清白蛋白的荧光猝灭机理

在激发波长为 280 和 295 nm 时, 人血清白蛋白分子中的色氨酸和酪氨酸具有荧光活性, 其发射峰位于 340~350 nm 左右^[23]. 与药物发生相互作用时, 人血清白蛋白荧光发射峰产生猝灭效应. 为了表达不同浓度药物对蛋白质荧光猝灭的程度, 定义了猝灭分数 q : $q=(F_0-F)/F_0$. 其中 F_0 和 F 分别为蛋白质与药物作用前后荧光发射峰的强度.

图 2 为人血清白蛋白分别与不同浓度罗布麻活性成分 QUE, RUT 和 CAT 作用引起的荧光猝灭分数的变化图. 从图中看出, QUE 引起蛋白质的荧光猝灭分数的变化要明显大于 RUT, CAT 对蛋白质的荧光猝灭很弱.

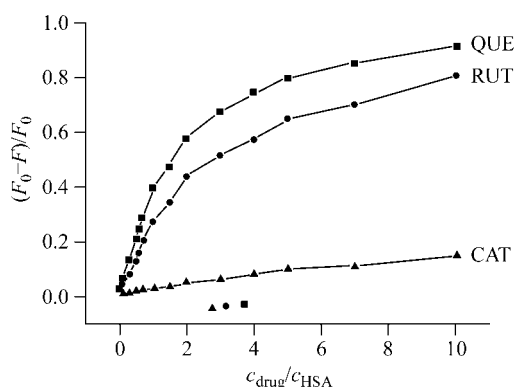


图 2 与不同浓度药物作用后人血清白蛋白荧光猝灭分数的变化

Figure 2 Alterations of fluorescence quenching fractions (q) of HSA after interacting with different concentrations of drugs $c_{\text{HSA}}=5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{drug}}/c_{\text{HSA}}$ was 0.01, 0.1, 0.3, 0.5, 0.6, 0.7, 1.0, 1.5, 2, 3, 4, 5, 7, 10. $T=25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda=280 \text{ nm}$

蛋白质的荧光猝灭过程可以用 Stern-Volmer 方程^[24]描述:

$$\frac{F_0}{F}=1+k_Q\tau_0[Q]=1+K_D[Q] \quad (1)$$

其中 $[Q]$ 为药物浓度, k_Q 为双分子猝灭过程速率常数, K_D 为 Stern-Volmer 常数, τ_0 为猝灭剂不存在时荧光体的寿命, 取平均荧光寿命为 5 ns^[19,24].

如果 Stern-Volmer 曲线为一直线, 说明只有一类荧光体, 它们与猝灭剂之间作用的机会均等. 但在大多数情况下, 是动态和静态猝灭同时存在的, 在这种情况下, Stern-Volmer 曲线不再是一条直线, 而是在猝灭剂浓度较高时沿 y 轴方向向上弯曲^[19,25]. 如果猝灭机理主要是静态猝灭, 则双分子猝灭过程速率常数(k_Q)要大于其生物分子在水溶液中的最大扩散系数($2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)

几个数量级^[19,25].

图 3 为 QUE, RUT 对人血清白蛋白荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线. 从图中看出, 对于 QUE, 在 $c_{\text{drug}}/c_{\text{HSA}} < 3.5$ 时, Stern-Volmer 曲线呈线性; 当 $c_{\text{drug}}/c_{\text{HSA}} > 3.5$ 时, 曲线偏离线性, 沿 y 轴方向向上弯曲, 对于 RUT, 在整个线性范围内, Stern-Volmer 曲线呈线性. 在线性范围内分别对 QUE 和 RUT 的 Stern-Volmer 曲线进行线性回归, 得到它们的回归方程如下: $y=(0.981 \pm 0.061)+(1.45 \pm 0.16) \times 10^5 Q$ ($R=0.997$, $n=5$); $y=(0.956 \pm 0.068)+(0.815 \pm 0.056) \times 10^5 Q$ ($R=0.997$, $n=5$). 根据公式(1), QUE 和 RUT 对人血清白蛋白荧光猝灭的速率常数 k_Q 分别为(平均荧光寿命为 5 ns): $(2.90 \pm 0.32) \times 10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (QUE); $(1.63 \pm 0.112) \times 10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (RUT). 在激发波长为 295 nm 的情况下, 得到了相似的结果.

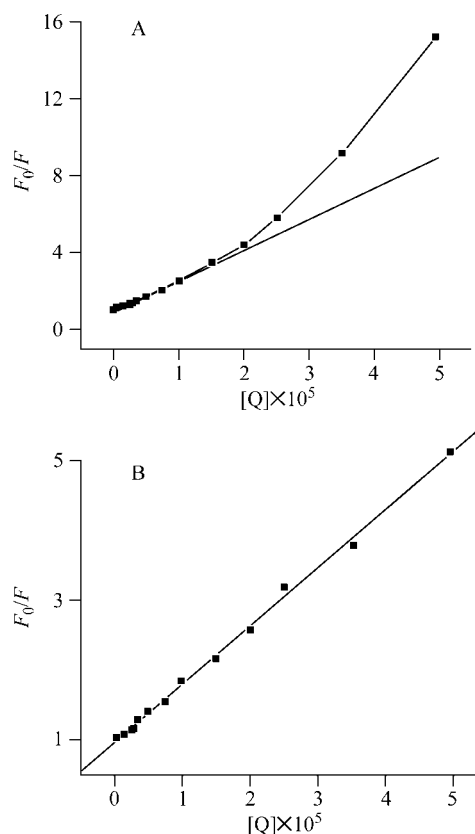


图 3 QUE (A)和 RUT (B)对人血清白蛋白荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线

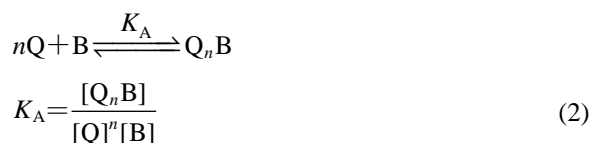
Figure 3 Stern-Volmer curves of HSA fluorescence quenching induced by QUE (A) and RUT (B), respectively $T=25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda=280 \text{ nm}$

QUE 和 RUT 对蛋白质的荧光猝灭速率常数大于其在水溶液中的最大扩散系数($2 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$) 3 个数量级, 说明药物分子对蛋白质的荧光猝灭机理主要为静态猝灭, 它们之间发生了特征结合, 形成了复合物. 当 QUE 与蛋白质的浓度比大于 3.5 时, 动态猝灭所占的

比例明显增加,使 Stern-Volmer 曲线偏离线性,此时的荧光猝灭机理为静态和动态猝灭同时存在^[19]. RUT 在整个实验浓度范围内,其 Stern-Volmer 曲线呈线性,说明它对蛋白质的荧光猝灭主要为静态猝灭过程. CAT 对人血清白蛋白的荧光猝灭非常弱,主要是动态猝灭引起,同时说明 CAT 不能与人血清白蛋白形成复合物.

2.2 罗布麻活性成分与人血清白蛋白结合常数

在药物分子对蛋白质的荧光猝灭为静态猝灭的情况下,药物分子与蛋白质形成了复合物. 假设药物分子 Q 在蛋白质分子 B 上有 n 个相同且独立的结合位点,则它们结合反应可表示为:



其中 K_A 为结合常数, $[B]$, $[Q]$ 分别为游离的蛋白质和药物浓度, $[Q_nB]$ 是复合物浓度. 若蛋白总浓度为 $[B_0]$, 则 $[Q_nB] = [B_0] - [B]$; 且静态猝灭中荧光体系的荧光强度 F 与其游离浓度成正比, $[B]/[B_0] = F/F_0$ ^[24,26-29]. 由此,式(2)可推导为:

$$\lg \frac{(F_0 - F)}{F} = \lg K_A + n \lg [Q] \quad (3)$$

以 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 作图,可求得药物与蛋白分子的结合常数 K_A 和结合位点数 n .

如果 $n=1$, 则公式(3)可简化为:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = 1 + \frac{1}{K_A[Q]} \quad (4)$$

由公式(4)可求得药物与蛋白分子的结合常数 K_A . 这两种计算结合常数方法的主要区别为公式(3)中高浓度的数据点对结合常数的影响较大,但公式(4)中低浓度的数据点对结合常数的影响较大. 在结合位点为 1 的情况下,主要关注低浓度数据点,所以用公式(4)计算较为合适,在结合位点数大于 1 时,只能够用公式(3)计算结合常数.

根据前面推导的应用药物对蛋白质荧光猝灭计算结合位点数(公式 3)的方法,以 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 的进行线性回归,得到 QUE 和 RUT 与人血清白蛋白的结合位点数,分别为: $n = 1.08 \pm 0.06$ ($R = 0.997$) 和 $n = 1.06 \pm 0.05$ ($R = 0.998$) (5 次测量平均值).

药物分子在人血清白蛋白上的结合位点数均为 1, 所以可以用公式(4)计算结合常数. 图 4 为基于公式(4)的双倒数曲线图 $[F_0/(F_0 - F)]$ 对 $1/[Q]$, 对它们进行线性

回归. 在药物与蛋白质浓度比为 0.3~10 的范围内,呈良好的线性关系,线性回归系数均大于 0.998. 根据回归曲线的斜率,分别得到它们与人血清白蛋白的结合常数(5 次测量的平均值)为: $(1.51 \pm 0.13) \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (QUE); $(0.81 \pm 0.08) \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (RUT).

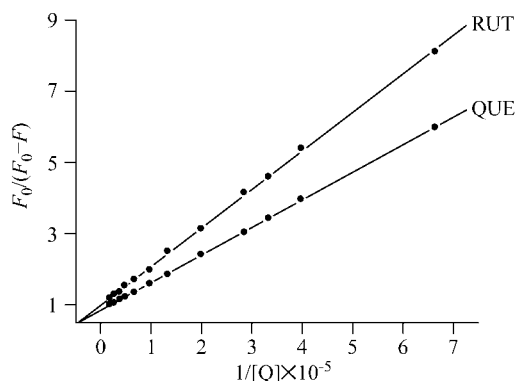


图 4 QUE 和 RUT 与人血清白蛋白相互作用的双倒数曲线
Figure 4 Double reciprocal curves of protein fluorescence quenching treated with QUE and RUT

$c_{\text{HSA}} = 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{drug}}/c_{\text{HSA}}$ was 0.3, 0.5, 0.6, 0.7, 1.0, 1.5, 2, 3, 4, 5, 7, 10. $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda = 280 \text{ nm}$

2.3 与人血清白蛋白作用后罗布麻活性成分的结构特征

2.3.1 pH 值对罗布麻活性成分结构的影响

QUE 和 RUT 为黄酮醇类化合物,分子中存在较大的共轭体系,其酚羟基有较强的酸性,图 5 为 QUE 和 RUT 在不同 pH 值条件下的紫外吸收光谱. 黄酮类化合物通常有两个主要的紫外吸收谱带,位于 300~400 nm 的谱带 I 是分子中 C 环和 B 环上的羰基共轭体系的紫外吸收,谱带 II 位于 240~300 nm 是 A 环与 B 环上羰基共轭体系的吸收峰^[23,27](见图 1).

在甲醇中,QUE 和 RUT 主要有两个紫外光谱吸收带,分别位于 374, 256 nm 和 363, 263 nm(见图 5A-a, 图 5B-a),它们是 B 环与 C 环共轭体系的吸收带 I 和 A 环与 C 环的吸收带 II(见图 1). 表 1 列出了在不同 pH 值条件下,QUE 和 RUT 两个主要紫外光谱吸收带的移动情况(与在甲醇中相比较). 在 pH 值为 6.4 和 3.5 的缓冲液中,吸收带 I 和 II 均呈现一定程度的蓝移,其中吸收带 I 的蓝移幅度较大,这种蓝移现象与溶剂极性的变化有关. 水溶液的极性要明显大于甲醇,溶剂与药物分子的作用改变了药物分子的电子能级,造成紫外吸收谱带的蓝移.

随着溶液 pH 值的增加,QUE 和 RUT 紫外吸收谱带均发生了明显的变化. 在生理 pH 值 7.4 时,QUE 吸收带 I 与在甲醇中相比明显加宽,而吸收带 II 在红移的同时

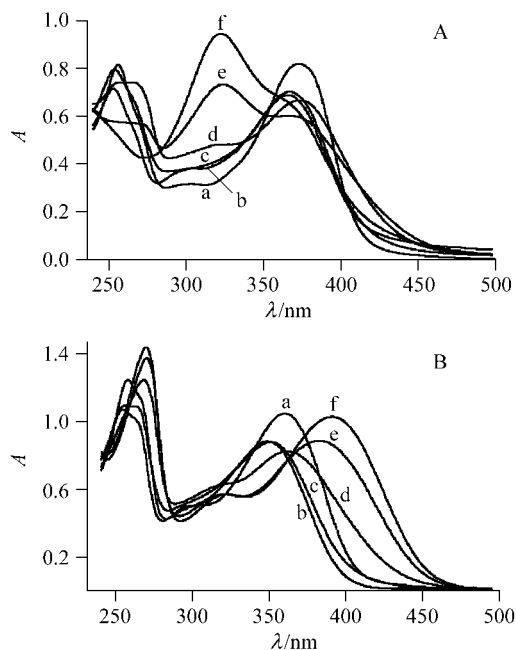


图5 QUE (A)和 RUT (B)在不同环境条件下的紫外吸收光谱
Figure 5 UV absorption spectra of QUE (A) and RUT (B) in various conditions

a—methanol pH: b—pH 3.5, c—6.4, d—7.4, e—8.4, f—9.0. $c_{\text{drug}}=5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $T=25 \text{ }^{\circ}\text{C}$

表1 不同 pH 值下 QUE 和 RUT 紫外吸收谱带的移动(与在甲醇中相比较)

Table 1 The shift (nm) of UV absorption bands of QUE and RUT at different pH value compared with that in methanol^a

Compound	Band	Methanol	pH				
			3.5	6.4	7.4	8.4	9.0
QUE	I	374	-8	-6	+1	0	-1
	II	256	-4	-2	+6	—	—
RUT	I	363	-12	-9	+3	+21	+31
	II	263	-4	-2	+6	+8	+8

^a “+” and “-” represent red and blue shifts of the bands individually compared with those in methanol.

谱峰变宽,并在 322 nm 左右出现了一个弱小的吸收带(见图 5A-d).当 pH 值增加到 8.4 时(见图 5A-e),322 nm 左右吸收峰的强度明显增强,且该峰随 pH 值的增加,谱峰强度逐渐增加,而同时 256 nm 处吸收带 II 的强度则随 pH 值的增加减弱,当 pH 值为 9.0 时,吸收带 II 几乎消失(见图 5A-f).吸收带 I 的强度随 pH 值的增加强度略微减弱,但峰位变化不大.对于黄酮醇类化合物处于 3, 7, 4'位的羟基由于解离后,易形成氧负离子扩大了 π 电子共轭的范围,从而造成其紫外吸收谱带的变宽和红移^[30].在 322 nm 左右的吸收峰应该归属为吸收带 II 的红移峰^[19],说明位于 A 环的酚羟基首先发生解离(7 位酚羟基发生解离的几率较大).QUE 的 $\text{pK}_{\text{a}1}$ 和 $\text{pK}_{\text{a}2}$ 值分别为 6.74 和 9.02^[31],在 pH 值 7.4 时,从图 5A-d 看出,322

nm 的吸收峰很弱,说明解离远没有完全,QUE 以中性分子和阴离子混合的形式存在,以中性分子为主.

RUT 紫外光谱吸收带 I 和 II 随 pH 值增加均发生红移,但吸收带 I 的红移幅度较大.在 pH 值 9.0 时,红移幅度达 30 nm 以上,说明位于 B 环上的酚羟基发生解离,形成了负氧阴离子^[30].在生理 pH 7.4 值时,RUT 紫外吸收谱带 I 的小幅度红移说明位于 B 环上的酚羟基仅仅部分解离,此时 RUT 也是以中性分子与阴离子状态共存的混合溶液,且以中性分子为主.

QUE 和 RUT 在结构上的区别在于 3 位的羟基被糖环取代,但从不同环境条件下的紫外吸收光谱看,它们的性质存在较大差异.QUE 分子在碱性条件下,位于 A 环上的酚羟基首先解离,而 RUT 则是位于 B 环上的酚羟基首先发生解离.这种差异将造成它们与蛋白质相互作用的强度、模式的不同.

对于 CAT,由于 A 和 B 环之间不存在共轭效应,与苯环相连的酚羟基的酸性较弱,它只有一个紫外吸收谱带,位于 280 nm 左右,且该谱带基本上不受 pH 值环境的影响(在 pH 值 3.5~9.0 范围内).

2.3.2 与蛋白质结合后罗布麻活性成分的结构特征

图 6 是不同浓度的 QUE(图 A)和 RUT(图 B)与人血清白蛋白相互作用后的紫外吸收光谱.从前面的讨论结果中可知,在生理 pH 7.4 条件下,QUE 以中性分子和 A

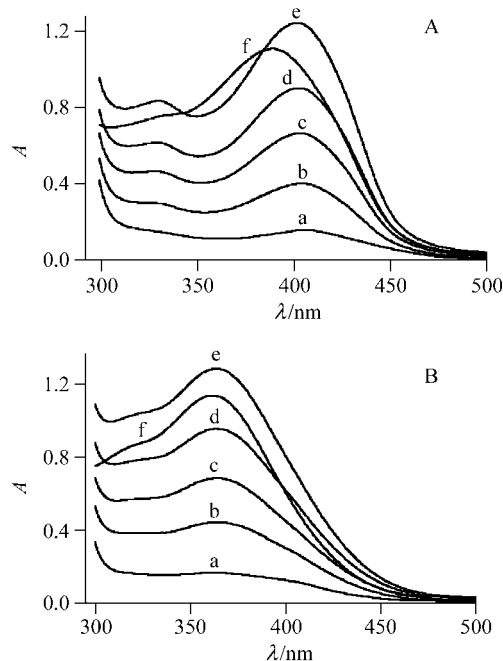


图6 QUE (A)和 RUT (B)与人血清白蛋白作用后的紫外吸收光谱

Figure 6 UV absorption spectra of QUE (A) and RUT (B) after interacting with HSA

$c_{\text{HSA}}=5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{drug}}/c_{\text{HSA}}=0.1$ (a), 0.3 (b), 0.5 (c), 0.7 (d), 1.0 (e). f: free drug, $c_{\text{drug}}=5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. $T=25 \text{ }^{\circ}\text{C}$

环上 7 位酚羟基部分解离的混合形式存在. 代表吸收带 I (B 和 C 环形成的共轭体系) 的紫外光谱吸收峰位于 374 nm 左右, 在与人血清白蛋白作用后, 该吸收带红移到 405 nm 左右 (药物与蛋白质的摩尔比为 0.1), 红移幅度达到了 30 nm 以上. QUE 吸收带 I 的大幅度红移表示 B 和 C 环形成的共轭体系上的羟基发生了解离, 形成了带负电荷的阴离子, 使共轭体系中电子的离域范围增加, 电子跃迁能级明显下降.

RUT 与人血清白蛋白相互作用后, 其紫外光谱吸收带 I 的峰位只有 3 nm 左右的红移, 峰型没有明显改变. 这种现象说明, 在 RUT 与蛋白质作用过程中 RUT 分子 B 环上的酚羟基没有发生解离. CAT 的紫外吸收谱与蛋白质的重叠, 从谱图上看不到有用的信息.

为了进一步揭示药物分子与蛋白质的作用机理, 对 QUE 和 RUT 与蛋白质作用前后紫外吸收光谱进行了二阶导数处理. 图 7 为药物与蛋白质浓度比为 0.1~1.0 时药物紫外吸收光谱(a~e)和游离药物(f)的二阶导数谱. 从谱图上看, 与蛋白质作用后, QUE 吸收带 I 的红移谱带分辨出了 4 个子谱带, 分别位于 393, 405, 418 和 426 nm. 其中 405 nm 左右的吸收带最强, 这种现象说明药物分子与蛋白质结合以后存在的状态不完全一致. 从游离药物的二阶导数谱看出, 其吸收带 I 为一个比较宽的单谱带, 位于 378 nm 左右, 与紫外吸收谱的 374 nm 相比有些偏离. 这可能是因为在其紫外谱图上该谱带为一宽谱带, 二阶导数谱反映的是谱图变化比较大处的峰位, 与实际的谱带位置略有不同.

药物与蛋白质相互作用, 除了在蛋白质的疏水腔内发生特征结合外, 在蛋白质的表面还存在着一些亲水性的官能团, 这些官能团与蛋白质之间可以发生非特异性的结合, 结合反应可以使药物的紫外吸收谱带发生一定程度的红移, 通常这种情况下红移幅度一般较小. 因此 405 nm 的谱带可以指认为药物与蛋白质发生特征结合引起药物紫外吸收谱带的红移峰, 而 393 nm 左右的吸收峰为蛋白质与药物发生非特异性结合后药物的吸收谱带. 在 418 和 426 nm 的弱的二阶导数谱峰可能跟药物的互变异构体有关^[32].

在药物与蛋白质作用后, 吸收 I 带的显著位移, 说明吸收带 I 代表的共轭体系上的羟基发生了解离, 它的解离将明显地抑制 A 和 B 环所形成的共轭体系上其它酚羟基的解离. 在图 7 中还可以看到, 游离药物在 319 nm 左右的吸收峰如前面讨论应该为吸收带 II 的红移峰^[19]. 与蛋白质作用后, 该谱带也明显地红移至 331 nm 左右, 说明药物分子 A 环上的酚羟基也直接参与了相互作用过程, 并在相互作用时酚羟基发生解离. 这样药物分子在与蛋白质作用时, 将会形成带双负电荷的阴离子. 两个

阴离子分别位于吸收带 I 和 II 所代表的两个共轭体系上, 它们分别与结合位点的氨基酸残基以离子键的形式结合.

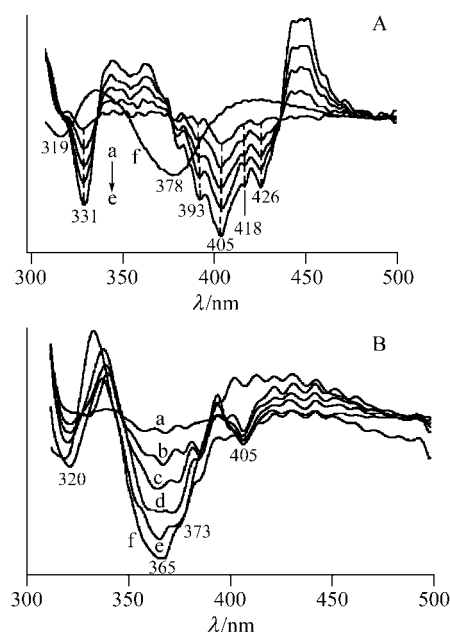


图 7 QUE (A) 和 RUT (B) 与蛋白质作用紫外吸收光谱的二阶导数谱

Figure 7 Second derivative spectra of the UV absorption spectra after QUE (A) and RUT (B) interacted with HSA

RUT 与蛋白质作用后, 其紫外吸收 I 带的二阶导数谱 (见图 7B) 呈双峰, 与游离药物的二阶导数谱对照发现, 其中一个峰为没有发生作用的药物, 另一个位于长波方向的峰为与蛋白质作用后的红移峰. 位于 320 nm 左右的吸收带 II 的吸收峰也有 3 nm 的红移. 从谱图上可以推断, RUT 在与蛋白质作用后, 其酚羟基没有发生解离, 它们之间主要是以氢键的形式发生结合.

2.3.3 人血清白蛋白对罗布麻活性成分的荧光增强效应

图 8 是 QUE (A) 和 RUT (B) 与不同浓度人血清白蛋白相互作用前后的荧光发射光谱. 在激发波长为 370 nm 时 (游离 QUE 吸收带 I 的紫外光谱最大吸收带), 游离 QUE 显示出双荧光发射峰 (见图 8A-a), 分别位于 420 和 470 nm, 它们分别是药物分子在正常状态和以互变异构体形式下的荧光发射峰. 这种现象是由在激发态时的质子转移 (excited-state proton transfer, ESPT) 引起的^[32]. QUE 分子双荧光发射峰的强度随着蛋白质浓度的增加而增强, 发射峰的峰位也明显蓝移. 从这两个发射峰的相对强度看, 互变异构体的强度 (470 nm) 与正常分子状态 (420 nm) 的比例随着蛋白质浓度的增加而显著降低. 在 QUE 分子中处于 3 与 4 位的羰基之间处于同一平面, 它们之间容易发生互变异构^[32], 470 nm 的发射峰为互变异构体的荧光发射峰, 420 nm 为药物分子处于正常

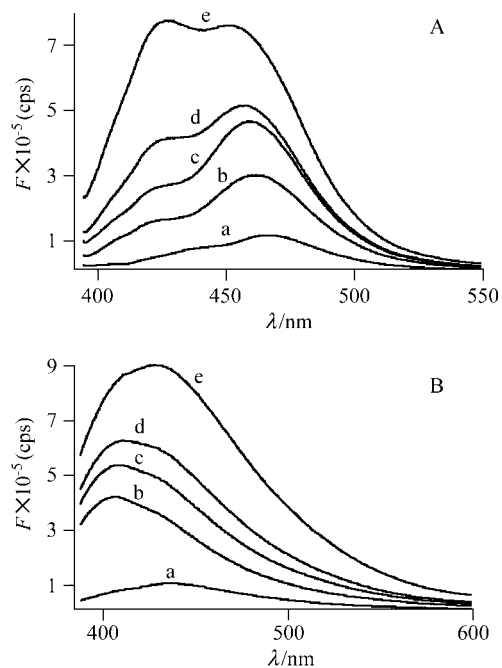


图8 QUE (A)和RUT (B)与人血清白蛋白结合后引起的荧光增强效应

Figure 8 Enhancement of the fluorescence emission band of QUE (A) and RUT (B) after binding with HSA

a: free drugs, $c_{\text{drug}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. $c_{\text{HSA}}/c_{\text{drug}} = 0.5$ (b), 1.0 (c), 2.0 (d), 3.0 (e). $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$ for QUE and $\lambda_{\text{ex}} = 367 \text{ nm}$ for RUT, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

状态下的荧光发射峰^[32,33]. 互变异构体与正常状态比例的变化说明, QUE与蛋白质结合后, 其结构出现了明显的变化. 互变异构现象主要跟 $\text{C}(4)=\text{O} \cdots \text{HO}-\text{C}(3)$ 形成的氢键情况有关, 与蛋白质的结合, 由于酚羟基的解离, QUE分子内的 $\text{C}(4)=\text{O} \cdots \text{HO}-\text{C}(3)$ 之间的形成氢键的几率降低.

RUT分子3位的羟基被糖环取代, 不能发生互变异构. 在367 nm激发波时, RUT分子的荧光发射峰呈现为单峰, 位于440 nm左右(见图8B-a), 随着人血清白蛋白的加入, 其荧光发射峰强度也明显增强, 同时峰位也发生显著位移, 蓝移至410 nm左右.

人血清白蛋白引起QUE和RUT荧光发射峰的明显增强进一步证明了它们之间发生了特征结合. 药物分子在激发态时的质子转移(excited-state proton transfer, ESPT)效率受溶剂的影响很大, 在缓冲溶液中, 水的强极性影响 $\text{C}(4)=\text{O} \cdots \text{HO}-\text{C}(5)$ 和 $\text{C}(4)=\text{O} \cdots \text{HO}-\text{C}(3)$ 之间氢键的形成. 在蛋白质分子的疏水性结合腔内, 环境对氢键的影响很小, ESPT效率明显增大, 其荧光发射强度随之增加^[34]. 同时也说明, 随着蛋白质浓度的增加, 越来越多的药物分子处于与蛋白质结合的状态.

3 结论

从实验结果看出, QUE和RUT均能够与人血清白

蛋白特征结合, 形成复合物; CAT由于C环4位没有羰基, 且2,3位间为单键, 使A, B环与C环之间无共轭效应, 不能与蛋白质发生特征结合. QUE和RUT结构的主要差异是QUE3位的—OH被芸香糖取代, 但它们与蛋白质作用的机理存在着明显的差异. 从结合强度看, QUE与蛋白质的结合能力要明显大于RUT. 在结合力方面, QUE与蛋白质在结合的过程中, 丢失水分子, 形成阴离子, 以静电力的形式与蛋白质结合; 但RUT分子与蛋白质结合时, 其酚羟基不发生解离, 以中性分子的形式与蛋白质发生结合. 由于QUE3位的游离酚羟基使其结构具有形成互变异构的可能性, 在蛋白质的结合位点内, 分子具有多重结构形式, 但RUT只能以一种结构形式存在于蛋白质的结合位点内. 它们这些结合模式的不同, 造成了它们药理药效的差异^[35].

References

- Murakami, T.; Kishi, A.; Matsuda, H.; Hattori, M.; Yoshikawa, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*(7), 845.
- Xue, H. M.; Qian, X. S.; Zhang, W. M.; Gu, G. P. *Chin. Wild Plant Resources* **2005**, *24*(4), 6 (in Chinese). (薛华茂, 钱学射, 张卫明, 顾龚平, 中国野生植物资源, **2005**, *24*(4), 6.)
- Ma, M.; Hong, C. L.; An, S. Q.; Li, B. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*(8), 2390.
- Zhou, L.; Wang, X. S.; Huang, H. P.; Zhou, Y. Q. *Res. Practice Chin. Med.* **2005**, *19*(5), 37 (in Chinese). (周丽, 王效山, 黄和平, 周亚球, 现代中药研究与实践, **2005**, *19*(5), 37.)
- Cao, Y.; Zhang, X.; Fang, Y.; Ye, J. *Microchim. Acta* **2001**, *137*(1-2), 57.
- Cao, Y.; Chu, Q.; Ye, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*(5), 691.
- Yokozawa, T.; Nakagawa, T. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, *42*(6), 975.
- Tagawa, C.; Kagawa, T.; Nakazawa, Y.; Onizuka, S.; Nishibe, S.; Kawasaki, H. *J. Pharm. Soc. Jpn.* **2004**, *124*(11), 851.
- Kwan, C.; Zhang, W.; Nishibe, S.; Seo, S. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2005**, *32*(9), 789.
- Kim, D.; Yokozawa, T.; Hattori, M.; Kadota, S.; Namba, T. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *72*(1-2), 53.
- Kim, D.; Yokozawa, T.; Hattori, M.; Kadota, S.; Namba, T. *Phytother. Res.* **2000**, *14*(7), 501.
- Xiong, Q.; Fan, W.; Tezuka, Y.; Adnyana, I. K.; Stampoulis, P.; Hattori, M.; Namba, T.; Kadota, S. *Planta Med.* **2000**, *66*(2), 127.
- Zhang, Z. *J. Life Sci.* **2004**, *75*(14), 1659.
- Butterweck, V.; Simbrey, K.; Seo, S.; Sasaki, T.; Nishibe, S. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2003**, *75*(3), 557.
- Butterweck, V.; Nishibe, S.; Sasaki, T.; Uchida, M. *Biol.*

- Pharm. Bull.* **2001**, 24(7), 848.
- 16 Casagrande, F.; Darbon, J. M. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, 61, 1205.
- 17 Lee, E. J.; Kim, S. R.; Kim, J.; Kim, Y. C. *Planta Med.* **2002**, 68(5), 407.
- 18 Xie, M. X.; Xu, X. Y.; Wang, Y. D. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1724, 215.
- 19 Xie, M. X.; Long, M.; Liu, Y.; Qin, C.; Wang, Y. D. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, 1760, 1184.
- 20 Boulton, D. W.; Walle, U. K.; Walle, T. J. *Pharm. Pharmacol.* **1998**, 50, 243.
- 21 Sengupta, B.; Sengupta, P. K. *Biopolymers* **2003**, 72, 427.
- 22 Zsila, F.; Bikadi, Z.; Simonyi, M. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 65, 447.
- 23 Xie, M. X.; Xu, X. Y.; Wang, Y. D.; Liu, Y. *Acta Chim. Sinica* **2005**, 63(22), 2055 (in Chinese).
(谢孟峡, 徐晓芸, 王英典, 刘媛, 化学学报, **2005**, 63(22), 2055.)
- 24 Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **1999**.
- 25 Chuang, V. T. G.; Hijioka, M.; Katsuki, M.; Nishi, K.; Hara, T.; Kaneko, K.; Ueno, M.; Kuniyasu, A.; Nakayama, H.; Otagiri, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1725, 385.
- 26 Xie, M. X.; Jiang, M.; Li, S.; Liu, Y. *Acta Chim. Sinica* **2004**, 62, 1460 (in Chinese).
(谢孟峡, 蒋敏, 李崧, 刘媛, 化学学报, **2004**, 62, 1460.)
- 27 Kang, J.; Liu, Y.; Xie, M. X. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1674, 205.
- 28 Jiang, M.; Xie, M.-X.; Zheng, D.; Liu, Y.; Li, X. Y.; Chen, X. J. *Mol. Struct.* **2004**, 692, 71.
- 29 Liu, Y.; Xie, M. X.; Kang, J.; Zheng, D. *Spectrochim. Acta, Part A* **2003**, 59, 2747.
- 30 Huang, L.; Yu, D. Q. *Application of Ultraviolet Spectroscopy in Organic Chemistry*, Science Press, Beijing, **2000**, p. 281 (in Chinese).
(黄量, 于德泉, 紫外光谱在有机化学中的应用, 科学出版社, 北京, **2000**, p. 281.)
- 31 Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Tosic, M.; Marjanovic, B.; Simic, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4846.
- 32 Guhray, J.; Segupta, B.; Sngupta, P. K. *Proteins* **2001**, 43, 75.
- 33 Sytnik, A.; Lritvinyuk, I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, 93, 12959.
- 34 Guharay, J.; Dennison, S. M.; Sengupta, P. K. *Spectrochim. Acta, Part A* **1999**, 55, 1091.
- 35 Pelzer, L. E.; Guardia, T.; Juarez, A. O.; Guerreiro, E. *IL Farmaco* **1998**, 53, 421.

(A0608292 PAN, B. F.; ZHENG, G. C.)