

[ 研究简报 ]

# 香豆素类中药有效成分与牛血清白蛋白结合的构效关系

刘雪锋, 夏咏梅, 曹玉华, 方云, 邹珠燕, 毛本刚, 丁漪  
(江南大学化学与材料工程学院, 无锡 214036)

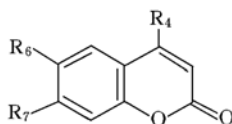
关键词 构效关系; 中药; 香豆素; 牛血清白蛋白; 荧光光谱

中图分类号 O648.162

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)01-0150-03

小分子(离子)与蛋白质和 DNA 等生物大分子间的相互作用一直是相关交叉领域的研究热点<sup>[1~7]</sup>, 本文主要用荧光光谱(FS)、紫外光谱(UV)从药物分子结构角度研究五种香豆素类中药有效成分 C I ~ C V (Scheme 1)与牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)结合时的构效关系。



$R_4 = H, R_6 = H, R_7 = OH$ , Umbelliferone(C I);  $R_4 = H, R_6 = H, R_7 = OCH_3$ , 7-methoxycoumarin(C II);

$R_4 = H, R_6 = OH, R_7 = OH$ , esculetin(C III);  $R_4 = CH_3, R_6 = H, R_7 = OH$ , 4-methyl-7-hydroxycoumarin(C IV);

$R_4 = CH_3, R_6 = OH, R_7 = OH$ , 4-methyl-6,7-dihydroxycoumarin(C V).

Scheme 1 The molecular structure of pharmaceuticals

## 1 实验部分

1.1 试剂与仪器 C II (m. p. 117.5 ~ 118.3 °C, 96.8%), C IV (m. p. 186.7 ~ 187.5 °C, 99.4%) 和 C V (m. p. 275.5 ~ 276.0 °C, 98.4%) 均由实验室自制, 并经 UV, IR 和 MS 确证; 其它实验试剂和仪器与文献[6]相同。

1.2 实验过程 实验中为进一步抑制溶液中 BSA 二聚体(dimmer)形成, 维持溶液离子强度的 NaCl 浓度确定为 0.15 mol/L<sup>[8]</sup>, 其它实验过程与文献[6]相同。

## 2 结果与讨论

2.1 香豆素类中药有效成分与 BSA 的相互作用信息 C I ~ C V 与 BSA 结合后与 C III 类似都能猝灭

BSA 的内源荧光(图 1), 其荧光发射光谱分别在 393, 355, 420, 386 和 412 nm 附近出现等发射点, 表明这五种小分子分别与 BSA 结合形成包加复合物<sup>[9]</sup>。

按照文献[5,6]方法处理实验数据得到香豆素类药物-BSA 结合过程的荧光猝灭常数( $K_{SV}$ 和 $K_P$ )、表观结合常数 $K_A$ 和结合位点数 $n$ 、结合过程的热力学参数、药物的 UV 光谱与 BSA 的 FS 光谱的图谱重叠积分 $J$ 、药物与 BSA 之间的能量转移效率 $E$ 以及药物与 BSA 荧光

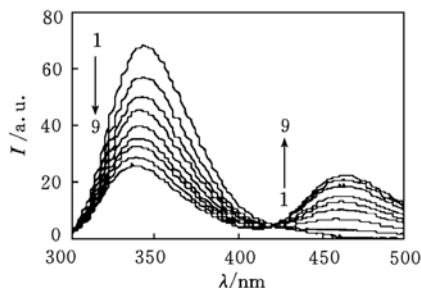


Fig. 1 Fluorescence spectra of CIII binding with BSA

$\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$ ; 50 mmol/L Tris-HCl buffer solution; pH = 7.4; 0.15 mol/L NaCl; 37 °C; BSA  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ; C III ( $10^{-5} \text{ mol/L}$ ) from 1 to 9: 0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5 and 4.0.

收稿日期: 2005-02-03.

基金项目: 江南大学自然科学预研基金(批准号: 2004LYY019)资助.

联系人简介: 方云(1957年出生), 男, 教授, 博士生导师, 从事胶体与界面科学和酶催化研究. E-mail: yunfang@126.com

性氨基酸残基间的平均空间距离  $r$  等作用参数(表 1).

**Table 1 The interaction parameters of pharmaceutical-BSA binding process**

Pharmaceutical	$t/^\circ\text{C}$	C I	C II	C III	C IV	C V
$10^{-4}K_{SV}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	30	3.72 ( $R^2=0.9905$ )	3.30 ( $R^2=0.9926$ )	4.45 ( $R^2=0.9927$ )	3.93 ( $R^2=0.9914$ )	6.00 ( $R^2=0.9764$ )
	37	3.62 ( $R^2=0.9930$ )	3.19 ( $R^2=0.9917$ )	4.22 ( $R^2=0.9940$ )	3.40 ( $R^2=0.9908$ )	5.58 ( $R^2=0.9798$ )
$10^{-4}K_p/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	30	2.26 ( $R^2=0.9988$ )	2.11 ( $R^2=0.9965$ )	2.54 ( $R^2=0.9960$ )	2.34 ( $R^2=0.9981$ )	3.06 ( $R^2=0.9984$ )
	37	2.23 ( $R^2=0.9973$ )	2.10 ( $R^2=0.9957$ )	2.46 ( $R^2=0.9952$ )	2.24 ( $R^2=0.9983$ )	2.94 ( $R^2=0.9989$ )
$10^{-4}K_A/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	30	4.97 ( $R^2=0.9950$ )	4.50 ( $R^2=0.9937$ )	5.82 ( $R^2=0.9943$ )	6.13 ( $R^2=0.9975$ )	8.47 ( $R^2=0.9962$ )
	37	4.80 ( $R^2=0.9917$ )	4.58 ( $R^2=0.9939$ )	5.58 ( $R^2=0.9926$ )	5.20 ( $R^2=0.9985$ )	8.11 ( $R^2=0.9914$ )
$n$	30	1.76	2.04	1.54	2.39	1.82
	37	1.73	2.22	1.61	2.38	1.97
$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	30	-3.75	1.77	-4.60	-18.46	-4.88
	37	-3.75	1.77	-4.60	-18.46	-4.88
$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	30	-27.24	-26.99	-27.64	-27.77	-28.58
	37	-27.78	-27.66	-28.17	-27.98	-29.13
$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	30	77.53	94.93	76.04	30.72	78.22
	37	77.54	94.93	76.04	30.71	78.22
$10^{15}J/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^3)$	30	6.30	6.97	15.32	11.34	15.98
	37	6.42	7.02	15.32	11.36	15.92
$E(\%)$	30	23.11	20.41	25.86	23.14	28.48
	37	22.99	19.84	24.47	23.01	27.42
$r/\text{nm}$	30	2.89	3.01	3.26	3.18	3.22
	37	2.90	3.04	3.30	3.19	3.24

鉴于低温下的  $K_{SV}$  和  $K_p$  比高温下的大, 由  $K_{SV} = k_q \times \tau_0$  ( $\tau_0$  取为  $10^{-8} \text{ s}^{[10]}$ ) 计算得  $k_q$  的量级为  $10^{12}$  (均远大于各种猝灭体对生物大分子的最大动态猝灭速率常数为  $2 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s}^{-1})^{[10]}$ ), 可推断 5 种香豆素类中药对 BSA 内源性荧光主要不是以分子扩散控制的动态猝灭而是静态猝灭, 此结论与出现等发射点和包加复合物形成等实验结果一致. 由  $\Delta G < 0$ ,  $\Delta S > 0$ , 表明结合过程是熵增加、Gibbs 自由能降低的自发过程, 熵增加是上述药物与 BSA 结合的共同热力学驱动力. 根据文献[11]的结论推断, C II 与 BSA 分子间疏水相互作用是其结合过程的另一种主要驱动力, 而其余 4 种药物分子与 BSA 分子之间除疏水作用外还有偶极-偶极静电相互作用.  $r$  数据表明中药小分子能够插入 BSA 分子内部, 非辐射能量转移与静态猝灭均是药物对 BSA 荧光猝灭的成因.

2.2 香豆素类中药有效成分与 BSA 结合的构效关系 表 1 中  $K_p$ ,  $K_A$  和  $E$  随分子结构变化存在  $C V > C III > C IV > C I > C II$  的规律. 经比较可发现: (1)  $C I > C II$ , 表明 7-取代基的极性减小和取代基体积增大不利于药物与 BSA 结合; (2)  $C IV > C I$  以及  $C V > C III$ , 表明 4-甲基能够促进药物与 BSA 结合; (3)  $C III > C I$  以及  $C V > C IV$ , 表明 6-羟基也能促进香豆素类药物与 BSA 结合; (4)  $C V > C III > C I$ , 说明当香豆素类中药分子中香豆素环上既有 4-甲基又有 6-羟基时, 这两类基团都具有增效作用. 但表 1 中  $r$  随药物分子结构的变化规律与上述规律不完全一致, 这可能是由于 4-甲基以及 6-羟基虽有利于增大香豆素类中药有效成分与 BSA 结合的推动力, 但同时使分子尺寸增大或极性增大, 对药物向 BSA 分子中疏水性空腔内插入产生负效应, 故使得  $n$  和  $r$  的变化规律与  $K_p$ ,  $K_A$  和  $E$  随中药分子结构的变化规律并不完全一致.

表 2 归纳了 C I ~ C V 分子结构变化对药物-BSA 结合过程的相关参数的影响, 分子中引入 4-甲基对药物-BSA 结合具有显著的增效作用, 能够较大程度地克服由空间位阻增大导致的负影响; 引入 6-羟

**Table 2 The structure-performance relationship of pharmaceutical -BSA binding process\***

Parameters	4-Me	6-OH	7-OCH <sub>3</sub>	Parameters	4-Me	6-OH	7-OCH <sub>3</sub>
$K_p$	+	+	-	$E$	+	+	-
$K_A$	+	+	-	$r$	-	-	-
$n$	+	-	+	$ \Delta G $	+	+	-

\* Annotation: + means  $K_p$ ,  $K_A$ ,  $n$ ,  $E$ ,  $|\Delta G|$  increasing and  $r$  decreasing, contrarily, - means  $K_p$ ,  $K_A$ ,  $n$ ,  $E$ ,  $|\Delta G|$  decreasing and  $r$  increasing.

基对药物-BSA 结合总体具有增效作用,但不足以完全抵消分子极性及其空间位阻增大等负影响;7-取代基的极性减小以及取代基体积增大不利于药物-BSA 的结合作用,其效应与引入 6-羟基几乎恰好相反。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Shen X. C. , Liang H. , Guo J. H. . J. Inorg. Biochem. [J], 2003, **95**: 124—130
- [ 2 ] HAN Mei-Jiao(韩美娇), WANG Ke-Zhi(王科志), LÜ Yuan-Yuan(吕媛媛) *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2004, **25**(12): 2221—2223
- [ 3 ] Xu T. W. , Fu R. Q. , Yan L. F. . J. Colloid Interf. Sci. [J], 2003, **262**: 342—350
- [ 4 ] Peng Z. G. , Hidajat K. , Uddin M. S. . J. Colloid Interf. Sci. [J], 2004, **271**: 277—283
- [ 5 ] LIU Xue-Feng(刘雪峰), XIA Yong-Mei(夏咏梅), FANG Yun(方 云) *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2004, **25**(11): 2099—2103
- [ 6 ] LIU Xue-Feng(刘雪峰), XIA Yong-Mei(夏咏梅), FANG Yun(方 云) *et al.*. Acta Chimica. Sinica(化学学报)[J], 2004, **62**(16): 1484—1490
- [ 7 ] Liu X. F. , Xia Y. M. , Fang Y. . J. Inorg. Biochem. [J], 2005, **99**: 1449—1457
- [ 8 ] Hunter A. K. , Carta G. . J. Chromatog. A[J], 2001, **937**: 13—19
- [ 9 ] YU Tian-Zhi(俞天智), TAO Zu-Yi(陶祖贻). Spectrosc. Spectr. Anal. (光谱学与光谱分析)[J], 1999, **19**(3): 453—455
- [ 10 ] Jiang C. Q. , Gao M. X. , Meng X. Z. . Spectrochim. Acta Part A[J], 2003, **59**: 1605—1610
- [ 11 ] Ross P. D. , Subramanian S. . Biochemistry[J], 1981, **20**: 3096—3102

## Structure-performance Relationship of some Chinese Herb Components Containing Structural Unit of Coumarin During Binding to Bovine Serum Albumin

LIU Xue-Feng, XIA Yong-Mei, CAO Yu-Hua, FANG Yun\*,  
ZOU Zhu-Yan, MAO Ben-Gang, DING Yi

(School of Chemical and Material Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract** The interaction between bovine serum albumin(BSA) and five active components of Chinese Herb C I—C V containing structural unit of coumarin was investigated by ultraviolet(UV) and fluorescence spectroscopy(FS). The intrinsic fluorescence of BSA was quenched by pharmaceuticals *via* forming pharmaceutical-BSA complexes. The quenching mechanism is mainly a combination of static quenching with nonradiative energy transfer. The parameters of pharmaceutical-BSA binding process, such as statistic quenching constant  $K_p$ , the apparent association constant  $K_A$ , the value of binding site  $n$ , the efficiency of energy transfer  $E$ , the spatial distance  $r$  and  $\Delta G$  were obtained. The above parameters disclose the structural-performance relationship of pharmaceutical-BSA interaction as follows. The process of pharmaceutical-BSA binding is promoted strongly by both 4-methyl and 6-hydroxyl in coumarin molecule, but the latter must endure simultaneously some adverse effects caused by increment of molecular polarity and stereo hindrance. Decreasing the polarity of 7-substituent group and increasing the volume of substituting group destroys the pharmaceutical-BSA binding, and the effect is almost totally opposite to that of 6-hydroxyl.

**Keywords** Structural-performance relationship; Chinese Herb; Coumarin; Bovine serum albumin; Fluorescence spectroscopy

(Ed. : D, I)