

紫外光谱研究中药大黄有效成分与牛血清白蛋白的相互作用

何梅¹, 夏之宁¹, 阴永光¹, 刘峥² (1. 重庆大学化学化工学院, 重庆 400044; 2. 成都市药品检验所, 四川 成都 610044)

摘要:目的 用紫外光谱研究大黄有效成分: 大黄素、大黄酸和大黄酚与牛血清白蛋白的相互作用, 了解大黄有效成分的生物结合活性。方法 采用紫外光谱法, 通过测量加入牛血清白蛋白后药物吸光度值的变化, 以 Scatchard 方程作图求解。结果 大黄三种主要有效成分: 大黄素、大黄酸和大黄酚与牛血清白蛋白相互作用的结合常数分别为 $K=1.47 \times 10^5$, $K=5.00 \times 10^5$, $K=1.18 \times 10^4$ 。其中大黄素与牛血清白蛋白的结合常数与文献值较一致, 大黄酸、大黄酚与牛血清白蛋白的结合常数未见报道。结论 从结合机制上对测定结果进行了探讨, 大黄类有效成分与牛血清白蛋白的结合能力随其所含极性基团的增多而增强。表明该方法研究药物-蛋白相互作用简便、快速、可行。

关键词: 大黄素; 大黄酸; 大黄酚; 牛血清白蛋白; 相互作用; 紫外光谱法

中图分类号: R282.710.5; R917.701 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2004)06-0429-04

Research on interactions between effective multicomponents of Radix et Rhizoma Rhei with bovine serum albumin by ultraviolet-visible spectra analysis

HE Mei¹, XIA Zhi-ning¹, YIN Yong-guang¹, LIU Zheng² (1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China; 2. Chengdu Institute for Drug Control, Chengdu 610044, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To investigate the interactions and binding ability between effective multicomponents from Radix et Rhizoma Rhei, including Emodin, rhein and chrysophanol, and bovine serum albumin (BSA). **METHOD** Based on the variety of absorption spectra of drugs, ultraviolet-visible spectra analysis and Scatchard equation were used to determine the binding constants of effective multicomponents from Radix et Rhizoma rhei to BSA. **RESULTS** The binding constants of effective multicomponents from Rhubarb were $K=1.47 \times 10^5$ for emodin, $K=5.00 \times 10^5$ for rhein, $K=1.18 \times 10^4$ for chrysophanol, respectively. The binding constant of emodin to BSA agreed well with that estimated by using other techniques. **CONCLUSION** Binding mechanism was discussed in this paper. It was found that the affinity of these compounds to BSA is related to their hydrophilicity. Experiments proved that the method is simple, rapid and feasible.

KEY WORDS: emodin; rhein; chrysophanol; bovine serum albumin; interaction; ultraviolet-visible spectra analysis

中药大黄的药理作用非常广泛, 具有泻下、健胃、抗菌、保肝、强心、降压等三十多种功效。其主要活性成分有大黄素(emodin)、大黄酸(rhein)、大黄酚(chrysophanol)、芦荟大黄素(aloe-emodin)和大黄素甲醚(emodin monomethyl ether)^[1]。为了研究大黄类有效成分在体内的代谢、转运过程, 开展其与血清蛋白的相互作用研究有重要意义。本实验采用紫外光谱法对大黄素、大黄酸和大黄酚与牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的相互作用进行了研究, 并对结合机制进行了探讨, 获得了满意的测量灵敏度, 为药物与蛋白质的相互作用研究提供了一种快速、简便、可行的方法。测得了大黄中三种组分与BSA的结合常数, 其中大黄酸、大黄酚与BSA相互作用的研究笔者尚未见文献报道, 大黄素与BSA的结合常数与文献值较一致^[2]。

新近研究血清蛋白质与内源性化合物及药物的相互作用非常广泛, 方法多集中为荧光光谱法^[3]、电化学法^[4]、平衡透析法^[5]、液相色谱法^[6]和毛细管电泳法^[7]等。用紫外光谱法研究中草药有效成分与血清蛋白质的相互作用时, 中草药有效成分具有较大的摩尔吸光系数, 与生命分子结合后这种具有较大摩尔吸光系数的组分会出现可被仪器正确识别的吸光下降。因此可用紫外光谱法研究中草药有效成分与生命分子的相互作用, 这不仅拓展了紫外可见光谱法的应用, 也打破了不易使用其他仪器方法开展相互作用研究的局限性。

1 方法

本实验的基本原理是分子受到其他分子作用后, 由于分子轨道能级改变而使吸收系数改变, 通过测量不同浓度作用

联系人: 夏之宁, 男, 教授, 联系电话: (023) 65106615。

基金项目: 国家自然科学基金(20175038)、教育部《跨世纪优秀人才培养计划》基金(教技函[2001]3)及教育部高校青年教师奖(教人司[2002]123)资助项目

下的吸光度变化,建立 Scatchard 方程,求解得到表达相互作用的参数,即结合常数 K。

设 BSA 的初始浓度为 C_{P0} ,反应平衡时游离态的 BSA 浓度为 $[P]$;药物的初始浓度为 C_{L0} ,反应平衡时游离态的药物浓度为 $[L]$,结合态的药物浓度为 $[L']$ 。在体系中加入过量的牛血清白蛋白,则各浓度之间的关系为: $C_{L0} = [L] + [L']$;由于 BSA 大大过量, $[P] \approx C_{P0}$ 。当反应达到平衡时溶液的吸光度值 A 是剩余的反应物 L,P 以及结合态的药物 L' 的吸光度的总和,表示为: $A = A_L + A_{L'} + A_P = \epsilon_L [L] + (\epsilon_{L0} - \epsilon_L) [L'] + \epsilon_P C_{P0}$ (比色皿为 1 cm,可省略)。

令 $\Delta A = A - \epsilon_L [L] - \epsilon_P C_{P0}$, $\Delta \epsilon = (\epsilon_{L0} - \epsilon_L)$, 所以 $\Delta A = \Delta \epsilon [L']$,即 $[L'] = \Delta A / \Delta \epsilon$ 。

根据 Scatchard 模型方程为:

$$\Delta A = - \frac{\Delta A}{KC_{P0}} + \Delta \epsilon C_{L0}$$

以 ΔA 对 $\Delta A / C_{P0}$ 作图,由拟合直线的斜率而获得结合常数 K。

2 实验

2.1 仪器及试剂

GBC-10e 紫外-可见分光光度计(GBC scientific equipment Pty. Ltd.),石英比色皿 1 cm;大黄素、大黄酸、大黄酚(化学对照品,纯度大于 98%,中国药品生物制品检定所);BSA(纯度 99%,中国医药上海化学试剂公司);其它试剂均为分析纯;二次去离子水。

2.2 实验方法

大黄素、大黄酸和大黄酚均难溶于中性水溶液,但均溶于乙腈。故实验采用含 20%乙腈的硼砂(0.025 mol/L)缓冲液, pH9.24。对缓冲液从 200~700 nm 进行吸收光谱的扫描,以去离子水作参比,波长范围内无明显吸收。各物质浓度见表 1。混合液在室温下混合均匀,放置过夜以保证结合反应已完全平衡。在 BSA 浓度是唯一可变参数的条件下,通过测量药物从 200~700 nm 的峰值吸收变化反映药物与 BSA 的相互作用。

3 结果与讨论

3.1 大黄素、大黄酸和大黄酚的吸收光谱特性

从图 1 中可以看出大黄素有四个吸收峰,分别位于 216.16,253.66,308.05 和 495.58nm;大黄酸的两个吸收峰位于 231.16 和 506.83nm;大黄酚的四个主要的吸收峰位于 227.41,249.91,291.17 和 508.71 nm。而 BSA 在 220 和

278nm 处有两个吸收峰,为了避免 BSA 吸收的干扰,三个大黄类有效成分的观察峰选在远离这两个吸收峰处。因此,大黄素选择 308 nm,大黄酸选择 506 nm,大黄酚选择 291 nm 观察吸收光谱的变化。

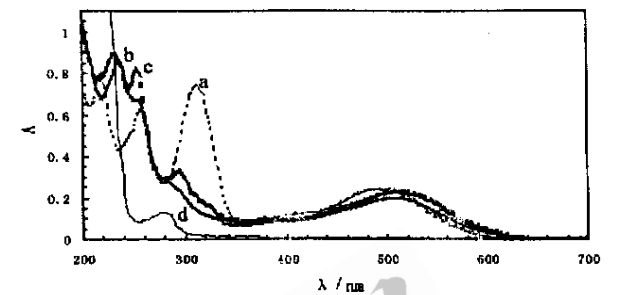


图 1 大黄素、大黄酸、大黄酚和牛血清白蛋白的吸收光谱

Fig 1 Absorption spectra of emodin, rhein, chrysophanol and BSA

Spectral conditions: Buffer solution: 0.025 mol/L disodium tetraborate and acetonitril (v/v = 4:1), pH9.24. a: emodin, 3.0×10^{-6} mol/L; b: rhein, 2.8×10^{-6} mol/L; c: chrysophanol, 3.2×10^{-6} mol/L; d: BSA, 3.0×10^{-6} mol/L

3.2 大黄素、大黄酸和大黄酚与 BSA 的相互作用

每次吸收光谱扫描时,均采用相同于试样中 BSA 浓度的溶液作参比,采用参比扣背景的测量模式。不断增加 BSA 的浓度,大黄素、大黄酸和大黄酚的峰值吸收随 BSA 浓度增加呈减小趋势。但当 BSA 浓度达到一定值时峰值吸收不再减小,推断大黄素、大黄酸和大黄酚与 BSA 的结合有饱和性,并且吸收值的变化与 BSA 的剂量成反比。继续增加 BSA 浓度,组分大黄素和大黄酚的吸收峰不再减小反而有增加趋势,这是由于 BSA 浓度过大,使测量的背景扣除功能受到影响,引起样品吸收峰增加。测得的结果列于表 1 中。根据公式(1)建立三物质与 BSA 相互作用的 Scatchard 线性回归曲线,由曲线的斜率求出三者与 BSA 的结合常数(见图 2)。大黄素、大黄酸和大黄酚与 BSA 相互作用的回归曲线的线性关系良好,相关系数分别为 0.986,0.975 和 0.964,表明测定结果具有一定的可靠性。有文献^[7]曾通过荧光光谱法测得大黄素和入血清白蛋白的结合常数为 $(2.85 \pm 0.15) \times 10^5$,并证明其大小应与牛血清白蛋白结合的 K 值近似,而本实验获得的结果 $K = 1.47 \times 10^5$ 与其较接近。

表 1 大黄素、大黄酸、大黄酚与牛血清白蛋白相互作用结果

Tab 1 The results of interaction between emodin, rhein and chrysophanol with BSA

No.	emodin				Rhein		Chrysophanol		
	$C_p (10^{-6} \text{ mol/L})$	ΔA_{308nm}	$\Delta A / C_p (10^3) C_p (10^{-6} \text{ mol/L})$		ΔA_{506nm}	$\Delta A / C_p (10^3) C_p (10^{-6} \text{ mol/L})$	ΔA_{291nm}	$\Delta A / C_p (10^3)$	
1	0.5	0.014	28.0	1.0	0.022	22.0	2.0	0.007	3.5
2	6.0	0.090	15.0	3.0	0.037	12.3	7.0	0.024	3.43
3	7.5	0.097	12.93	6.0	0.045	7.5	10.0	0.033	3.3
4	15.0	0.139	9.27	12.0	0.057	4.75	13.0	0.041	3.15
5	30.0	0.170	5.67	15.0	0.060	4.0	16.0	0.049	3.06
$K = 1.47 \times 10^5$					$K = 5.00 \times 10^5$		$K = 1.18 \times 10^4$		

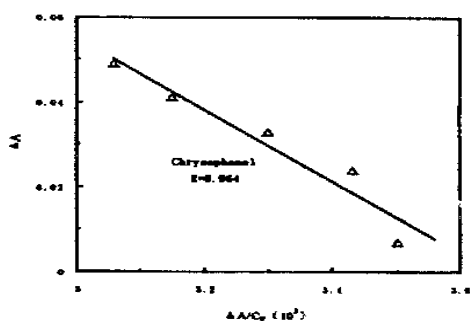
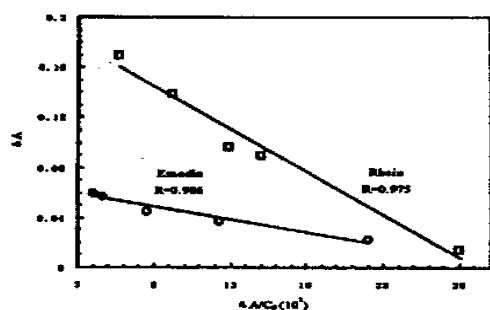


图2 大黄素、大黄酸、大黄酚与牛血清白蛋白相互作用的线性拟合曲线

Fig 2 Linear regression curve for determining the interactions of emodin, rhein and chrysophanol with BSA

3.3 测定结果的评价

公式(1)是在假定BSA的浓度远远过量的条件下得出的结论。实验中为扣除BSA吸收光谱的干扰,用相同浓度的BSA溶液作参比,在既适合光度测量又处于平衡区间内的BSA浓度越小,测量结果越准确。从图3中可以看出加入

BSA后吸收光谱呈规律性变化,并有等吸收点,证明混合液中有两个纯物质发生了反应,而且光谱吸收值的变化是由于反应引起了物质摩尔吸光系数的改变。其中大黄酸的最大吸收值的变化率 $\Delta A/A$ 达到了30.3%。

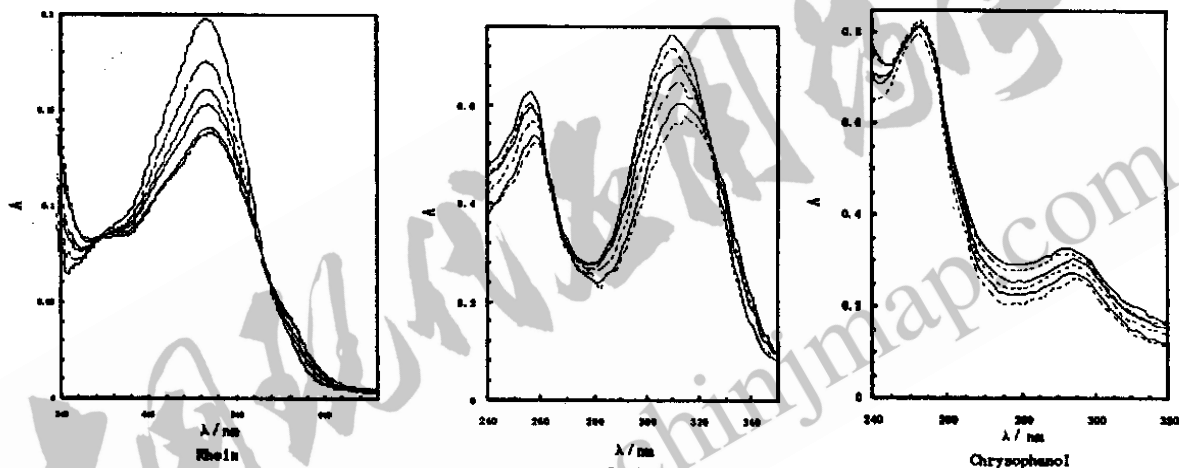


图3 大黄素、大黄酸、大黄酚与牛血清白蛋白结合后吸收光谱的变化

Fig 3 Absorption spectra of emodin, rhein and chrysophanol bound to BSA in different concentrations

光谱差的变化是基于生色团经受一定的环境变化,引起吸光度发生变化。这种环境变化包括生色基团与其他物质结合或受到掩蔽,也包括溶剂、pH值、温度和浓度等因素变化。本实验固定其他因素,使BSA浓度成为唯一可变因素,考察BSA引起的中药大黄几种有效成分吸收光谱变化。每个样品测量3次,每次测量前将样品静置5 min,考察测量的稳定性和重现性,测量误差为0.5%。研究中采用了3次测定结果的平均值。

由于吸光值差 ΔA 仅是总吸光值 A 的百分之几,例如对于大黄酚与BSA相互作用测量中,虽然可以满足相互作用分析的要求,但准确性相对较差。如果 $\Delta A/A$ 有1%,这种误差传递至 K 值将有相对较大的影响。故在这种吸光比率 $\Delta A/A$ 较小的情况下,光谱扫描必须使用具有纵坐标量程扩展和低杂散光的光度计,并且仪器充分预热稳定^[8]。本实验仪器参数符合要求且配有恒温系统。通过对实验误差的考察,结合常数的测定误差小于10%。

4 大黄素、大黄酸和大黄酚与BSA结合的机制探讨

BSA是由氨基酸残基组成的单肽链的蛋白质,相对分子质量约为67 000。其分子内有大量的极性氨基酸,在水中具有很高的溶解度。整个分子可以看成由3个结构类似的结构域组成。每个结构域由两个亚结构域构成疏水性腔,这些空腔在立体结构上可与特异性的配基互补,产生疏水性结合。此外,处于一定的环境之下,BSA分子一般带有电荷,可与带电配体发生非特异性的静电相互作用^[8]。这种结构和功能与人血清白蛋白(HSA)极为相似,因此药物与BSA的结合机制和药物与HSA的结合机制基本一致,将此用作药理学、药物代谢动力学研究也同样适用。结构式见图4。

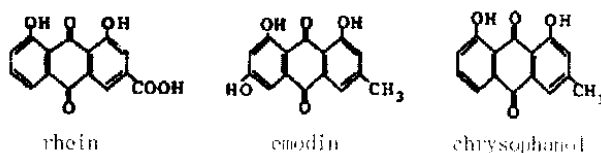


图4 几种大黄有效成分的分子结构示意图

Fig 4 The molecular structure of main effective components of Radix et Rhizoma Rhei

在本实验的缓冲溶液中,由于 pH 值大于 BSA 的等电值,BSA 带负电荷,而大黄素、大黄酸和大黄酚在此条件下也同样带一定的负电荷,由此推断大黄中的这几种成分与 BSA 的结合主要不是非特异性的静电结合。从分子结构上来看(见图 4),这种结合应该是疏水性结合,实验结果也说明了这一点。大黄酸分子中含有两个羟基和一个羧基,可嵌入 BSA 的疏水性腔进行结合。而大黄素芳环上含有三个羟基和一个甲基,由于甲基的空间阻碍,不能很好的嵌入 BSA 的疏水性腔,在与 BSA 的结合能力上要弱于大黄酸。大黄酚的芳环上只含有两个羟基和一个甲基,与 BSA 的结合能力在三者中最弱。这三个大黄类有效成分的亲水性大黄酸 > 大黄素 > 大黄酚,与 BSA 的结合能力大黄酸 > 大黄素 > 大黄酚,结合能力随其所含极性基团的增多而增强。

5 结论

本实验采用紫外光谱法实现了对大黄素、大黄酸和大黄酚与 BSA 结合常数的测定,分别为 $K=1.47 \times 10^5$, $K=5.00 \times 10^5$, $K=1.18 \times 10^4$ 。大黄酸和大黄酚与 BSA 相互作用的研究笔者尚未见文献报道,大黄素与 BSA 相互作用的结合常数与文献值较一致,表明该方法准确可行,是药物与蛋白质相互作用研究中较易实现的方法,而且也拓展了紫外可见光谱法的应用。进一步对大黄类有效成分与蛋白质结合的机制进行了探讨,大黄类有效成分与 BSA 的结合能力随其

所含极性基团的增多而增强。

参考文献

- [1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编(上册)[M]. 第二版. 北京:人民卫生出版社,1996:62~65.
- [2] 张保林,王文清,白凤莲. 蒽醌及黄酮类化合物与人血清白蛋白的结合反应研究[J]. 高等学校化学学报,1994,15(3):373.
- [3] 王敬政,贺吉香,江崇球. 芦荟大黄素与血清白蛋白的相互作用[J]. 分析化学,2001,29(7):782.
- [4] Henrique ET, Koiti A, Sergio D. A cyclic voltammetry experiment illustrating redox potentials, equilibrium constants and substitution reactions in coordination chemistry[J]. J. Chem Education, 2000, 77(10):1351.
- [5] 黎世能,王浴生,雷军. β -内酰胺酶介导的阴沟杆菌对 β -内酰胺类抗生素耐药机制的研究[J]. 中国抗生素杂志,1994,21(2):121.
- [6] 汪海林,邹汉法,张玉奎. 微透析-液相色谱法研究药物与蛋白竞争结合[J]. 中国科学(B辑),1998,28(1):71.
- [7] 夏之宁,刘勇,屈鹏程等. 相互竞争体系结合常数的亲和毛细管电泳分析[J]. 分析化学,2001,29(10):1188.
- [8] 阎隆飞,孙之荣. 蛋白质分子结构[M]. 北京:清华大学出版社,1998:50~65.

收稿日期:2003-03-17