

## 二价铜、锌离子对盐酸巴马亭与牛血清白蛋白结合反应光谱的影响研究

张立伟\* 杨 频 王 芳

(山西大学分子科学研究所, 太原 030006)

关键词: 盐酸巴马亭 牛血清白蛋白 铜离子 锌离子 光谱  
分类号: O614 Q50

血清白蛋白是一种重要的运输蛋白,其与内源化合物及许多药物的相互作用已有比较广泛的研究,但尚未见到生命体中存在的多种微量元素对药物与蛋白结合作用影响的报道。我们研究了在铜、锌离子存在下,盐酸巴马亭与牛血清白蛋白结合反应的光谱特性,这对更全面地阐明小分子化合物与血清白蛋白的结合具有一定的意义。

### 1 实验部分

实验中所用溶液均用去离子水配制,使用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 保持离子强度,用 Tris-HCl 作为缓冲液,pH 值为 7.4,配制 BAS(Sigma 产品),盐酸巴马亭(化学对照品,中国药品与生物制品检定所)及氯化铜,氯化锌溶液,浓度依次为 $8.76 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , $8.76 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , $6.48 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1.15 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

荧光(LS-50B 荧光光谱仪)滴定中,使用 1 cm 比色皿,测定了(1)固定激发波长为 280 nm,分别用盐酸巴马亭对 BSA、BSA +  $\text{Cu}^{2+}$  (浓度比为 1:2)、BSA +  $\text{Zn}^{2+}$  (浓度比为 1:2)进行荧光滴定,观察 BSA 的荧光发射峰的变化。(2)固定激发波长为 280 nm,分别测定药物和药物中加入 BSA(浓度比为 1:1)时的荧光光谱,观察药物荧光发射峰的变化。(3)用铜离子,锌离子分别滴定药物与白蛋白 1:1 复合物溶液,观察巴马亭荧光发射谱。

### 2 结果与讨论

#### 2.1 巴马亭对白蛋白的荧光猝灭

在荧光滴定中,随着巴马亭浓度的增加,BSA 在 345 nm 处的荧光发射峰强度逐渐减小,并有少许红移(图 1)。表明巴马亭对牛血清白蛋白有较强的猝灭作用。药物对白蛋白的猝灭可能主要有三种方式:动态猝灭,静态猝灭和能量转移猝灭。按照 Stern-Volmer 方程<sup>[1]</sup>,求得 20℃ 时

的表观猝灭常数  $K_q$  ( $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ ), 药物滴定 BSA 时为  $1.01 \times 10^{13}$ , 滴定 BSA +  $\text{Cu}^{2+}$  时为  $1.10 \times 10^{13}$ , 滴定 BSA +  $\text{Zn}^{2+}$  时为  $1.01 \times 10^{13}$ , 都远大于各种猝灭剂对生物大分子的最大扩散猝灭常数 ( $2 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ )。这表明动态猝灭不是引起牛血清白蛋白荧光猝灭的主要原因。通过测定药物的吸收光谱并与 BSA 的发射光谱比较, 发现两者有较程度的重叠(图2), 比较药物中加入白蛋白(1:1)以及不加 BSA 时药物的荧光发射峰(图3), 可看到药物中加入白蛋白后, 荧光发射峰(523 nm)强度增大且发射峰明显紫移。依据 Förster 无辐射能量转移理论, 可以认为牛血清白蛋白色氨酸残基和巴马亭之间发生了能量转移, BSA 和巴马亭荧光光谱的变化主要是通过能量转移而引起的。

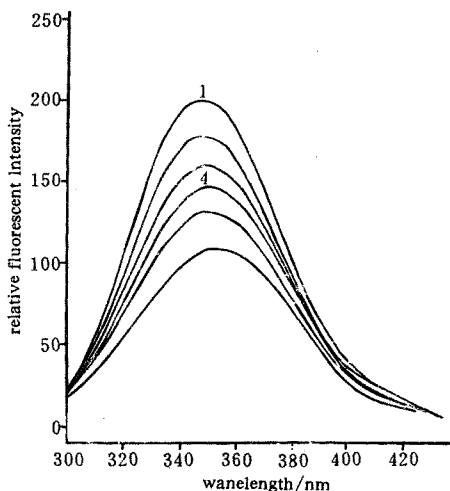


图1 巴马亭对 BSA 的荧光猝灭光谱

Fig. 1 Fluorescence quenching spectra of Palmatine hydrochloride to BSA

3 mL BSA ( $8.76 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), added palmatine hydrochloride ( $8.76 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) gradually, 1; 0, 2; 5, 3; 10, 4; 20, 5; 30, 6; 45  $\mu\text{L}$ .  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$

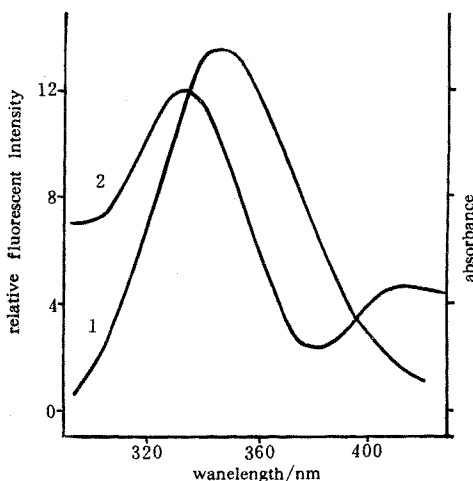


图2 BSA 荧光光谱与巴马亭紫外吸收谱的重叠光谱

Fig. 2 Overlap between the fluorescence emission spectra of bovine serum albumin (1) and absorption spectrum of Palmatine hydrochloride (2)

$C_{\text{BSA}}: 8.76 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ ,  $C_{\text{palmatine}}: 8.76 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

## 2.2 巴马亭与牛血清白蛋白结合解离常数和结合部位

根据 Linerweaver-Burk 方程  $(F_0/F)^{-1} = F_0^{-1} + K_D F_0^{-1} [Q]^{-1}$  [2] 作  $(F_0/F)^{-1}$  对  $[Q]^{-1}$  的双倒数图, 由图直线斜率求得在  $20^\circ\text{C}$  巴马亭与牛血清白蛋白以及在铜、锌离子存在下, 巴马亭与 BSA 配合的解离常数  $K_D$  分别为  $9.84 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $9.71 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $8.98 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 线性相关系数分别为: 0.997, 0.999 和 0.997。由此可见, 铜、锌离子存在对巴马亭与牛血清白蛋白结合平衡没有影响, 巴马亭可以被白蛋白贮存, 运载。

按照 Förster 理论, 荧光体与猝灭体之间的能量转移效率 ( $E$ ) 与两者之间距离 ( $r$ ) 的关系为:  $E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$ , 其中  $R_0$  为  $E$  等于 50% 时对应的距离,  $R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 n^{-4} \Phi J$  (式中  $K$  为取向因子,  $n$  为介质的折射指数,  $\Phi$  为无猝灭体时荧光体的量子产率,  $J$  为光谱重叠积分, 对于 BSA,  $K^2 = 2/3$ ,  $\Phi = 0.10$ ,  $n = 1.45$  [3], 按下式计算  $J$  ( $\text{cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) 值:

$$J = \sum F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda / \sum F(\lambda) \Delta\lambda$$

式中  $F(\lambda)$  为 BSA 在波长  $\lambda$  处的荧光强度,  $e(\lambda)$  为猝灭体在  $\lambda$  处的摩尔吸光系数, 根据图 2 对 280~400 nm 波长范围进行积分求得  $J$ 。利用前面测定的白蛋白与巴马亭摩尔比为 1:1 的缔合物的荧光强度, 根据  $E=1-F/F_0$ , 求得 BSA、BSA + Cu<sup>2+</sup> 和 BSA + Zn<sup>2+</sup> 的能量转移效率分别为 0.525、0.508 和 0.531, 进而求得巴马亭的第一结合部位与 BSA 分子中某一色氨酸残基距离  $r_1$  (nm) 分别为: 2.2、2.22 和 2.19。三个数据十分接近, 因此可认为铜、锌离子对巴马亭与白蛋白结合的部位无影响, 据此可推测, 铜、锌离子与 BSA 结合后不影响白蛋白的构象, 以及它们与牛血清白蛋白的结合部位和巴马亭与牛血清白蛋白的结合部位不同。根据文献报道铜的第一结合位点位于白蛋白第 I 结构域<sup>[4]</sup>。结合在牛血清白蛋白第 III 结构域中的大黄素与 212-色氨酸基的距离为 2.16 nm<sup>[1]</sup>, 和巴马亭与牛血清白蛋白结合的  $r_1$  值相近。所以, 可以认为巴马亭第 I 结合部位位于结构域 III 中, BSA 荧光的猝灭主要来自 212-色氨酸。

### 2.3 铜离子对巴马亭荧光峰的猝灭

用铜离子, 锌离子滴定巴马亭与白蛋白的复合物时, 发现锌离子对巴马亭的荧光发射峰无影响, 而随铜离子浓度增大时巴马亭的荧光峰被逐渐猝灭, 而在无 BSA 存在时, 铜离子对此荧光峰强度无影响。此现象的发生很可能是由巴马亭与白蛋白形成复合物后, 巴马亭荧光发射峰被敏化, 但由于铜离子的加入, 铜离子与 BSA 也发生结合作用, 铜离子与 BSA 复合物的最大吸收峰约在 530 nm<sup>[5]</sup>, 此时与巴马亭荧光峰发生较大重叠, 因此, BSA 结合的药物与铜离子之间又发生了能量转移, 使巴马亭荧光被猝灭。

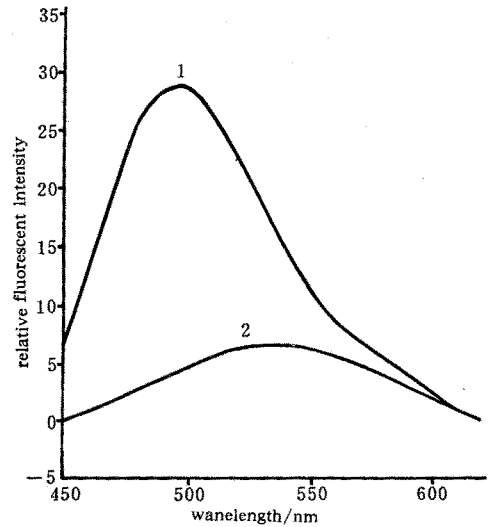


图3 BSA 对巴马亭荧光光谱的影响  
Fig. 3 Effect of BSA on emission spectra of Palmatine hydrochloride  
1: Palmatine hydrochloride-BSA (1:1),  
2: Palmatine hydrochloride  
 $\lambda_{ex}$ : 280 nm  $C_{BSA}$ :  $8.76 \times 10^{-6}$  mol · L<sup>-1</sup>

### 参 考 文 献

[1] ZHANG Bao-Lin(张保林) et al *Huaxue Xuebao(Acta. Chem. Sin.)*, 1994, 52, 1213.  
[2] YANG Man-Man(杨曼曼), YANG Pin(杨 频), ZHANG Li-Wei(张立伟) *Kezue Tongbao (Chinese Sci. Bull.)*, 1994, 39(1), 31.  
[3] Charies E. B., Hudson B. S. *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 391.  
[4] Perters T., Blumenstock F. A. *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 1574.  
[5] YANG Bing-Sheng(杨斌盛), YANG Pin(杨 频) *Shengwu Huaxue Yu Shenwu Wuli xuebao (Acta Biochimica et Biophysica Sinica)*, 1989, 21(3), 245.

# SPECTROSCOPIC STUDIES ON BINDING OF PALMATINE HYDROCHLORIDE TO BOVINE SERUM ALBUMIN INFLUENCED BY ZINC( II ) AND COPPER ( II )

ZHANG Li-Wei YANG Pin WANG Fang

*(Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006)*

The binding of Palmatine hydrochloride to bovine serum albumin (BSA) was studied, in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ , with fluorescence spectrum and ultra-violet spectrum. The results show that  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  don't influence the first binding constant of Palmatine to BSA and the binding site of it to BSA. But  $\text{Cu}^{2+}$  has the fluorescence quenching effect on sensitive fluorescence of medicine binding to BSA.

**Keywords:**

**Palmatine hydrochloride  
spectrum**

**bovine serum albumin**

**$\text{Cu}^{2+}$**

**$\text{Zn}^{2+}$**