

丹参酮 II A 等中草药有效成分与白蛋白结合反应的光谱研究

张立伟, 杨 频*, 王 芳

(山西大学分子科学研究所, 山西 太原 030006)

摘 要 在 β -环糊精存在的缓冲体系中,利用光谱法研究了丹参酮 II A 等有效成分与人血清白蛋白(HSA)的结合反应。结果表明:丹参酮 II A 等与 HSA 结合后,紫外吸收有红移现象,且吸收强度增加;它们对 HSA 的荧光有较强的猝灭作用。根据 Lineweaver-Burk 双倒数图,求得了它们与 HSA 的解离常数,基于 Förster 无辐射能量转移机理,确定了它们的第一结合部位与 HSA 中 214 位色氨酸残基的距离。

主题词 丹参酮 II A; 隐丹参酮; 人血清白蛋白; β -环糊精

中图分类号: O657.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2001)05-0694-03

血清白蛋白是一种重要的运输蛋白,其与许多内源性化合物和外源化合物的结合作用已有较广泛的研究,但迄今对其与中草药有效成分的作用研究还很少,尤其是具有生理活性且难溶于水的化合物。有报道^[1],在 pH 10.0 的条件下研究了蒽醌及黄酮类化合物与牛血清白蛋白的结合作用,此条件下,药物溶解度增大,但是与生理条件(pH 7.4)有一定的差别,且此时白蛋白构象也有一定变化。本文采用一种新的体系— β -环糊精($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、磷酸钠($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、氯化钠($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的缓冲体系,在 pH 7.4 条件下对难溶于水的丹参酮 II A 等化合物与 HSA 相互作用进行了研究。

1 实验

1.1 试剂和仪器

人血清白蛋白(Sigma, 美国),丹参酮 II A,隐丹参酮(本研究室自提^[2]),槲皮素(分析纯,经重结晶),其他试剂均为分析纯;UV-365 紫外-可见分光光度计(岛津),LS-50B 荧光光谱仪。

1.2 实验缓冲体系及药物浓度的确定

在 pH 7.4 时,在水溶液中丹参酮 II A 等药物溶解度极小,不易采用荧光滴定法来研究与白蛋白的相互作用。 β -环糊精(β -CD)存在一个立体手性疏水腔,可以有选择性地包含多种客体分子,形成超分子化合物,使许多水溶性差的药物形成超微囊而增大其溶解性。因此,我们选用组成为 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 β -CD, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_3PO_4 , pH 7.4 的缓冲液为研究体系,其中 β -CD 作为药物的载体来增大溶解性。药物溶液的制备:将一定量的药物加入缓冲液中,超声振荡约 10 min,静置,过滤即得药物溶液,用紫外吸收光谱确定其浓度。具体作法

如下:配制一系列药物标准溶液(溶剂为 1:1 的甲醇-缓冲溶液),测定吸光度并绘标准工作曲线。将未知浓度的药物溶液稀释配制成和标准液完全一致的溶剂条件,测吸光度,由标准工作曲线即可确定药物浓度。

1.3 光谱测定

将 $1.07 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1.01 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.08 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丹参酮 II A,隐丹参酮和槲皮素与白蛋白混合(浓度比为 1:1),20 °C 反应数小时至完全平衡,测定吸收光谱,并同时测定相应各浓度的药物的吸收光谱。用药物进行荧光滴定时,移取 3 mL $3.95 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HSA 于 1 cm 比色皿中,用微量进样器逐次滴加药物,固定激发波长 280 nm,记录 295~500 nm 的发射峰强度。

2 结果与讨论

2.1 吸收光谱

丹参酮 II A 等药物与 HSA 结合后,可见区最大吸收波长均发生红移,且吸收强度增加,其中丹参酮 II A 由 452 nm 红移至 458 nm,隐丹参酮由 437 nm 红移至 456 nm,槲皮素由 342 nm 红移至 349 nm。这表明这些药物均与 HSA 发生了相互作用,且结合部位的极性小于外部水溶液^[3]。

2.2 丹参酮 II A 等药物对 HSA 荧光的猝灭效应

丹参酮 II A 等药物滴定 HSA 过程中,HSA 的荧光强度逐渐下降,同时在长波方向又出现一个新的发射峰,且都存在一个等发射点,其中丹参酮 II A 和隐丹参酮的等发射点为 403 nm(见图 1),槲皮素的等发射点为 405 nm。引起 HSA 荧光猝灭的原因可能有 3 个方面:动态猝灭、静态猝灭和能量转移。按 Stern-volmer 方程 $F_0/F = K_q \tau_0 [Q]$,其中 $[Q]$ 为对

收稿日期:2000-01-30,修订日期:2000-07-20

基金项目:山西省自然科学基金资助项目

作者简介:张立伟,1963年生,山西大学分子科学研究所副教授 * 通讯联系人

应猝灭体浓度, τ_0 为 HSA 的荧光寿命, 约为 10^{-9} s, 求得各药物的表现猝灭常数 $K_q[(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$ 为: 丹参酮 II A 4.42×10^{13} , 隐丹参酮 4.81×10^{13} , 槲皮素 3.59×10^{13} , 都远大于各种猝灭体对生物大分子的最大扩散猝灭常数 $[2 \times 10^{10} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]^{[4]}$ 。表明动态猝灭不是引起 HSA 荧光猝灭的主要原因。由图 1 可以看到在药物滴定 HSA 过程中, HSA 的荧光被逐渐猝灭, 而在长波方向出现一个逐渐增高的新发射峰; 且各药物的吸收峰与白蛋白的发射峰有不同程度的重叠(图 2), 据 Förster 无辐射能量转移理论, 当化合物在 HSA 中的结合部位与发光基团的距离小于 7 nm 时, 发光基团和各猝灭体之间便可发生能量转移, 使 HSA 荧光被猝灭, 各药物的荧光被敏化。因此, 可以认为丹参酮 II A 等药物使 HSA 荧光被猝灭, 主要是通过能量转移机制实现的。

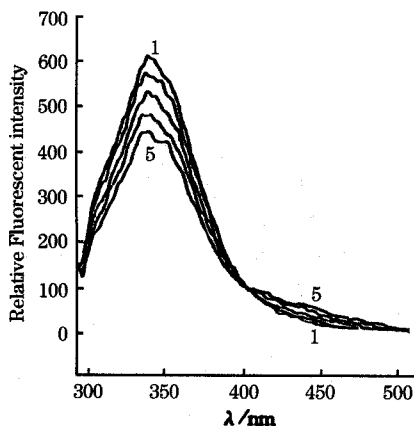


Fig.1 Fluorescence quenching spectra of Tanshinone II A to HSA

HSA: $3.95 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$

curve: 1—0 μL 2—10 μL 3—25 μL 4—40 μL 5—50 μL

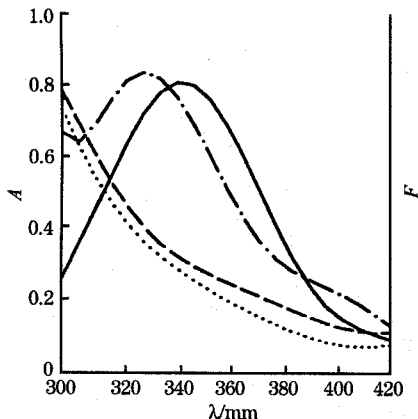


Fig.2 Overlap between the fluorescence emission spectra of HSA (—) and absorption spectrum of Tanshinone II A (.....), Cryptotanshinone (---), Quercetin (-.-)

HSA: $3.95 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$

2.3 丹参酮 II A 等与 HSA 作用的解离常数

根据 $(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_D F_0^{-1} [Q]^{-1}$ [5], 由 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 $[Q]^{-1}$ 作 Lineweaver-burk 双倒数图(见图 3), 由直线斜率可求得各药物与 HSA 结合的解离常数, 丹参酮 II A: $8.4 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 隐丹参酮: $6.12 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 槲皮素为: $1.09 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 线性相关系数分别为: 0.996, 0.997 和 0.999。由 K_D 值可知, 三种药物与白蛋白的结合都较强, 这说明它们都可以被白蛋白所贮存, 运载。

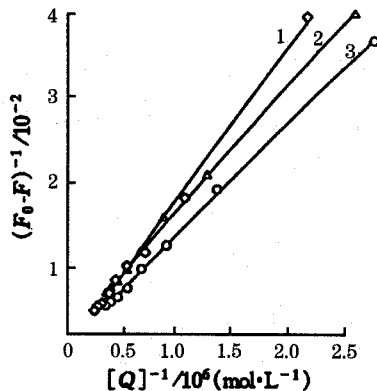


Fig.3 Double reciprocal plot of fluorescence strength of HSA and concentration of Tanshinone II A(1), Cryptotanshinone(2), Quercetin(3).

2.4 荧光给体—受体间距离

根据 Förster 理论, 荧光体和猝灭体之间的能量转移效率 (E) 和两者之间的距离 (r) 的关系为: $E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$, 其中 R 为 $E = 50\%$ 时对应的距离, $R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 n^4 \Phi J$, 式中 K^2 为取向因子, 取 $2/3$, n 为介质的折射指数, 取 1.45 [6], Φ 为荧光体的量子产率, 取 0.118 , J 为光谱重叠积分(图 2)。 J 值按下式计算:

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

式中 $F(\lambda)$ 为在波长 λ 时的荧光强度, $\epsilon(\lambda)$ 为猝灭体在 λ 处的摩尔消光系数, 将波长为 $295 \sim 445 \text{ nm}$ 范围内的重叠光谱划分为极小的面积求和得 $J(\text{cm}^3 / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 值, 丹参酮 II A 为 0.7×10^{-14} , 隐丹参酮为 1.05×10^{-14} , 槲皮素为 1.13×10^{-14} 。再根据 $E = 1 - F/F_0$, 求得各药物与 HSA 按 1:1 缔合时的 E 值, 进而求得各药物的第一结合位点与 HSA 分子中第 214 位色氨酸残基的距离 r_1 分别为: 丹参酮 II A 为 2.92 nm ; 隐丹参酮为 2.86 nm , 槲皮素为 2.58 nm 。Charles 等人估算的胆红素与 214 位色氨酸残基之间的距离为 2.7 nm , 上述三种药物的 r_1 值与胆红素的 r_1 值相近。据此, 可以初步推测上述三种药物可能结合在白蛋白的第三结合区。

参 考 文 献

- [1] ZHANG Bao-lin, et al(张保林等). *Acta Chimica Sinica* (化学学报), 1994, **52**:1213.
- [2] WANG Qing-wei, et al(王庆伟等). *J. of Shanxi University* (山西大学学报), 1994, **17**(3):294.
- [3] J W Donovan. *Physical Principal and Technique of Protein Chemistry*(S J Leach), part A, New York: Academic Press, 1969, 101.
- [4] W R Ware. *J. Phys. Chem.*, 1962, **66**:455.
- [5] YANG Man-man, et al(杨曼曼等). *Chinese Science Bulletin* (科学通报), 1994, **39**(1):31.
- [6] E B Charles and Hudson. *J. Biol. Chem.*, 1979, **254**:391.

Spectroscopic Studies on the Binding of Effective Component of Chinese Herbs with Human Serum Albumin

ZHANG Li-wei, YANG Pin, WANG Fang

Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract Tanshinone II A and Cryptotanshinone are the main effective components of the traditional Chinese medicine *salvia miltiorrhiza* bung. They both have many kinds of physiologic activities. When a medicine enters the body, it always goes to the acceptor site and has pharmacodynamic action by way of storage and carriage of plasma. Serum albumin is the major serum protein, which can combine with many inner and outer source compounds. In this paper, we have studied the interaction of Tanshinone with the human serum albumin(HSA) in β -CD buffer system by spectroscopic method. The results show that the absorption maximum of Tanshinone exhibit red shift upon binding to HSA and the absorbance enhance. Tanshinone have stronger fluorescence quenching effect on HSA and the dissociation constants of Tanshinone bound to HSA are calculated. The distance of protein Trp-214 to the first binding site is also calculated on the basis of energy transfer between HSA and bound Tanshinone.

Keywords Tanshinone II A; Cryptotanshinone; Human serum albumin; β -CD

(Received Jan. 30, 2000; accepted July 20, 2000)