

文章编号:1000-582X(2004)02-0059-04

# 鱼腥草素钠与血清白蛋白结合常数的电泳法测定\*

连春霞<sup>1</sup>,甘婷婷<sup>1</sup>,陈华<sup>1</sup>,袁佩<sup>2</sup>,夏之宁<sup>1</sup>

(1. 重庆大学化学化工学院,重庆 400030; 2. 重庆医科大学药学院,重庆 400016)

**摘要:**采用毛细管电泳峰漂移法测定了鱼腥草素钠(SH)与人血清白蛋白(HSA)在碱性缓冲液条件下的结合常数。用3种求解结合常数的方法,即双倒数法、y-倒数法、x-倒数法,进行数据处理,求得结合常数分别为 $4.072 \times 10^4$ 、 $3.845 \times 10^4$ 和 $3.791 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。SH与HSA结合较强,结合比为1:1,此结合参数为进一步研究SH在体内的运输、分布以及活性提供了重要信息。

**关键词:**鱼腥草素钠;人血清白蛋白;结合常数;毛细管电泳

**中图分类号:** O658

**文献标识码:** A

癸酰乙醛是中草药鱼腥草中主要抗菌活性成分,因其易于聚合失效,常被制成亚硫酸氢钠加成物,即鱼腥草素钠(sodium houttuyfonate, SH)<sup>[1]</sup>,结构如图1所示。SH具有广泛的抗菌、抗病毒、抗炎作用,还可增强体内白细胞吞噬功能,从而提高机体免疫能力<sup>[2-3]</sup>,因而在“非典型性肺炎”时期再度引起人们的关注。但是由于SH在水中溶解性能不佳并且具有强烈的鱼腥气味,使其制剂和体内代谢研究受到一定限制。笔者已用毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)研究了SH与 $\beta$ -环糊精的包结作用,对SH的剂型改善提供了参数<sup>[4]</sup>。因为药物进入人体后,一般都要通过血浆的储存和运输,送到受体部位,从而发生药理作用。血清白蛋白又是血浆中含量最高的载体蛋白,它能与外源性药物作用,因而研究药物分子与血清白蛋白的相互作用,可以为药物在体内的运输、分布、活性、毒性以及新陈代谢提供重要信息<sup>[5-6]</sup>。笔者采用CE测定了SH与人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)的结合常数,为进一步研究该药的药物代谢动力学和药效学建立了基础。

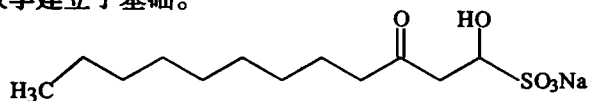


图1 鱼腥草素钠的结构式

## 1 实验材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

自组装毛细管电泳仪,配备有0~30 kV可调高压电源,波长范围为190~600 nm的UV/Vis单波长检测器;数据采集和处理:HW-2000色谱工作站(南京千谱软件有限公司);石英毛细管柱(内径75  $\mu\text{m}$ ,总长65.0 cm,有效长度50.7 cm,河北永年锐洋色谱器件有限公司);GBC-10e紫外-可见光谱仪(澳大利亚GBC公司)。

鱼腥草素钠(分析纯,北京第二制药厂),人血清白蛋白(生化试剂,上海生物制品研究所),磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸(分析纯,重庆北碚化学试剂厂),Tris(化学纯,Farco chemical supplies),丙酮(分析纯,重庆东方试剂厂),水为二次去离子水。

### 1.2 实验条件与方法

电泳运行电压为15 kV(正向电泳);紫外检测波长为280 nm;电泳缓冲溶液为20  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐和80  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris溶液,pH值为8.4,并含不同浓度的HSA;电迁移方式进样,进样电压为15 kV,进样时间为3 s。以丙酮为电渗流标记物,以便扣除电渗流的

\* 收稿日期:2003-09-03

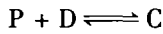
基金项目:国家自然科学基金资助项目(20175038);教育部“高校青年教师奖”资助项目(教人司[2002]123)

作者简介:连春霞(1978-),女,河南郑州人,重庆大学硕士研究生,主要从事毛细管电泳相互作用研究。

影响。在每次电泳前均用运行缓冲液冲洗毛细管 5 min。相同条件重复操作 2 次,实验结果取 2 次的平均值。

## 2 数据处理方法

本实验采用峰漂移法<sup>[7]</sup>(又称为淌度移动法)测定 SH 与 HSA 的结合常数。将蛋白(P)加入到缓冲溶液中,将药物(D)作为样品,在电泳过程中,二者发生结合反应,形成结合物(C),假设结合比为 1:1,即



结合常数  $K_b$  可以表示为:

$$K_b = \frac{[C]}{[P][D]} \quad (1)$$

式中,  $[C]$  为结合物的平衡浓度,  $[P]$  为蛋白的平衡浓度,通常以蛋白的总浓度代替,  $[D]$  为药物的平衡浓度。

则带电配体的电泳淌度则由游离配体和结合物的电泳淌度共同决定:

$$\mu_i = \frac{[D]}{[D] + [C]}\mu_f + \frac{[C]}{[D] + [C]}\mu_c \quad (2)$$

式中,  $\mu_i$  为药物与结合物的混合物的电泳淌度,  $\mu_f$  为游离药物的电泳淌度,  $\mu_c$  为结合物的电泳淌度。

由式(1)、(2)可得:

$$\mu_i = \frac{\mu_f + \mu_c K_b [P]}{1 + K_b [P]} \quad (3)$$

将式(3)变形可得:

$$\frac{1}{\Delta\mu} = \frac{1}{K_b(\mu_f - \mu_c)[P]} + \frac{1}{\mu_f - \mu_c} \quad (4)$$

$$\frac{[P]}{\Delta\mu} = \frac{[P]}{\mu_f - \mu_c} + \frac{1}{K_b(\mu_f - \mu_c)} \quad (5)$$

$$\frac{\Delta\mu}{[P]} = K_b(\mu_f - \mu_c) - K_b\Delta\mu \quad (6)$$

式中  $\Delta\mu = \mu_f - \mu_i$ 。计算式(4)、(5)、(6)分别称为双倒数法、y-倒数法、x-倒数法<sup>[8]</sup>。采用以上 3 种方法作图,即可求得结合常数  $K_b$  和结合物的电泳淌度  $\mu_c$ 。

带电配体的电泳淌度可通过式(7)求得:

$$\mu_i = \frac{Ll}{V} \left( \frac{1}{t_i} - \frac{1}{t_{0i}} \right) \quad (7)$$

式中,  $L$  和  $l$  分别为毛细管的总长度和有效长度,  $t_i$  和  $t_{0i}$  分别为带电配体和电渗流标记物的迁移时间。

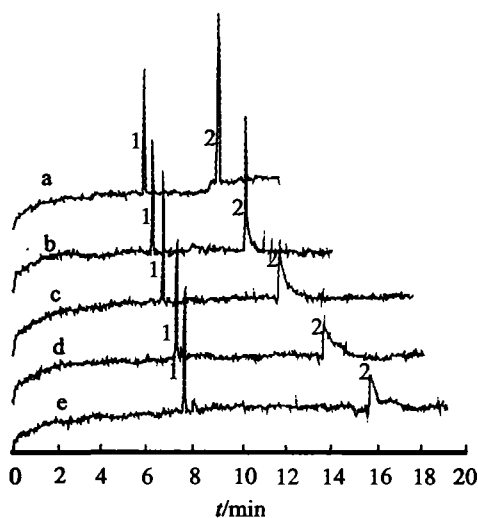
## 3 结果及讨论

### 3.1 缓冲溶液的选择

由图 1 可以看出,SH 有 9 个碳的直链结构的疏水基团,由于疏水作用在毛细管壁有较强的吸附,引起峰的严重展宽,为此必须选择合适的缓冲溶液。解决吸附的简单有效的办法有两个,一是增加缓冲溶液的浓度,二是提高 pH 值。实验中考察了磷酸盐缓冲溶液和 Tris 缓冲溶液。发现高浓度的磷酸盐缓冲溶液虽然能抑制吸附,但电流较大,产生的焦耳热大,重现性差。高浓度的 Tris 缓冲溶液电流虽然较小,但 SH 的峰前伸严重,可能是由于缓冲溶液与样品的电导不匹配的原因。考虑采用混合缓冲溶液,通过改变 Tris 和磷酸盐的浓度和比例,调节缓冲液的 pH 值和离子强度。最终确定分离条件为  $80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Tris 和  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的磷酸盐混合缓冲溶液, pH 值为 8.4,此条件下峰形较好,电流适中,且重现性好。

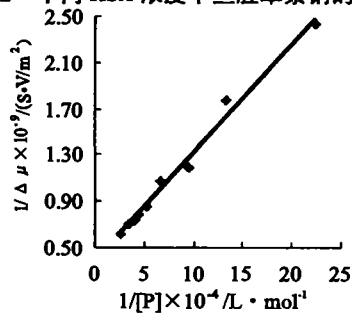
### 3.2 SH 的迁移时间及峰形的变化

在实验中,以恒定浓度的 SH 和丙酮作试样液,每次均以此进样,但可以改变缓冲溶液中 HSA 的浓度,得到如图 2 中所示的电泳谱图。由图 2 可知,随着 HSA 的浓度由 0 增大到  $37 \mu\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,SH 的迁移时间也逐渐增加。引起迁移时间变化的主要原因,是由于结合作用生成了结合物,由公式(2)可以看出,当蛋白的浓度不同时,结合物的摩尔分配比就会变化,相应的混合物的电泳淌度就会变化。另一原因是,由于 HSA 浓度的增加,缓冲溶液的粘度增大,电渗流变小,此变化可通过标记物丙酮迁移时间的变化来反映和扣除。在实验中还观察到,未加 HSA 时,SH 峰尖锐并略有前伸,而随着蛋白浓度的增加,它的峰变矮,展宽严重,且出现拖尾现象。出现这种现象的原因主要有:一是结合物和游离药物的电荷数不同,离子半径相差较大,从而使二者的电泳淌度不一致。二与结合物的动力学常数有关,若结合物的分解动力学常数与迁移时间相差不多,则峰形展宽最严重。另外,峰变矮的原因除了展宽拖尾以外,还有两个原因,一是与蛋白作用后,SH 的吸收性质发生变化,最大吸收波长向长波长方向移动,可由图 3 说明。另一个是蛋白的加入引起背景吸收,抬高了基线。

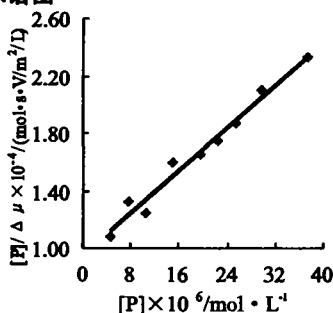


1. 丙酮; 2. 鱼腥草素钠  
运行电压, 15 kV; 检测波长, 280 nm; 运行缓冲溶液, 80 mmol · L<sup>-1</sup> tris + 20 mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸盐, pH = 8.4; 电迁移进样, 15 kV × 3 s; 缓冲溶液中 HSA 的浓度: a. 0 μmmol · L<sup>-1</sup>, b. 10 μmmol · L<sup>-1</sup>, c. 20 μmmol · L<sup>-1</sup>, d. 25 μmmol · L<sup>-1</sup>, e. 37 μmmol · L<sup>-1</sup>

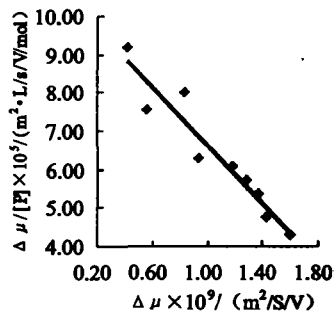
图 2 不同 HSA 浓度下鱼腥草素钠的电泳谱图



(a) 双倒数法



(b) y-倒数法



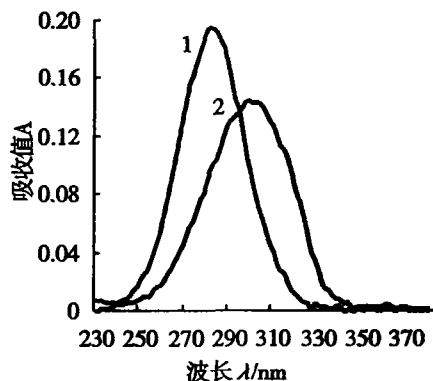
(c) x-倒数法

图 4 3 种求解 SH 与 HSA 结合常数方法的曲线图

表 1 3 种方法求解结果

方法	结合常数 $K_b/L \cdot mol^{-1}$	$\mu_c \times 10^8$ $/(m^2/s/V)$	$\mu_c/\mu_f$	相关系数 $r$
双倒数法	$4.072 \times 10^4$	-2.667	1.109	0.994
y-倒数法	$3.845 \times 10^4$	-2.677	1.113	0.988
x-倒数法	$3.791 \times 10^4$	-2.680	1.114	0.958

由表 1 可知, SH 与 HSA 结合常数  $K_b$  在  $3.90 \times 10^4 L \cdot mol^{-1}$  左右, 二者结合较强。参数  $\mu_c/\mu_f$  可用来评估配体分子形成结合物前后分子大小的变化, 此值约为 1.11。3 种数据处理方法原理是相似的, 但求得的结果却有差异, 主要与蛋白浓度的变化梯度有关。因为 3 种作图法中除 y-倒数法的横坐标以外, 其它坐标值都是经过二次处理的数值, 若浓度梯度选择不合理, 会导致点的分布相对集中。而在所选浓度梯度



1. 样品:  $6.0 \mu mol \cdot L^{-1}$  的 SH; 2. 样品: 与  $7.5 \mu mol \cdot L^{-1}$  HSA 混合温育 12 h 的  $6.0 \mu mol \cdot L^{-1}$  的 SH

图 3 SH 的紫外吸收光谱图

### 3.3 SH 与 HSA 结合常数的求解

由数据处理部分可知, 分别用式(4)、(5)、(6)作图即可求得二者的结合常数及结合物的电泳淌度, 结果如图 4 和表 1。

下, y-倒数法数据点分布均匀, 结果相对合理。3 种方法的线性相关性都较好, 充分说明二者的结合比为 1:1。

## 4 结 语

毛细管电泳在药物与蛋白的结合研究中, 以其特有的优势, 如需样量少、快速以及易自动化等, 而倍受青睐。它所提供的参数信息可以帮助我们了解药物与蛋白的结合/解离的过程, 调整给药剂量。随着电泳技术和生物技术的日臻完善, 毛细管电泳相互作用分析法在药物筛选和受体蛋白结合机理的研究中也必将发挥重要作用。

## 参考文献:

- [1] 魏世超, 徐利君, 曾勤, 等. 鱼腥草素  $\beta$ -环糊精包合物的研究[J]. 中国药学杂志, 1999, 34(3): 167-169.
- [2] 李下平. 鱼腥草研究进展[J]. 基层中药杂志, 2001, 15(3): 45-46.
- [3] WANG D Y, YU Q H, EIKSTADT P, et al. Studies on adjuvanticity of sodium houttuifonate and its mechanism[J]. International Immunopharmacology, 2002, 2: 1 411 - 1 418.
- [4] 夏之宁, 项顺锋, 李珍义, 等. 鱼腥草素钠与  $\beta$ -环糊精包络常数的电泳法研究[J]. 药学学报, 2003, 38(1): 42-45.
- [5] SHIBUKAWA A, ISHIZAWA N, KIMURA T, et al. Plasma protein binding study of oxybutynin by high-performance frontal analysis[J]. Journal of Chromatography B, 2002, 768: 177-188.
- [6] QUAGLIA M G, BOSSÒ E, DELL' AQUILA C, et al. Determination of the binding of a  $\beta_2$ -blocker drug, frusemide and ceftriaxone to serum proteins by capillary zone electrophoresis[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1997, 15: 1 033 - 1 039.
- [7] 夏之宁, 刘勇, 屈鹏程, 等. 锰离子与草酸共存体系的毛细管电泳相互作用分析[J]. 冶金分析, 2001, 21(5): 12-17.
- [8] BELLINI M S, DEYL Z, MANETTO G, et al. Determination of apparent binding constants of drugs by capillary electrophoresis using  $\beta$ -cyclodextrin as ligand and three different linear plotting methods[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 924: 483-491.

## Determination of the Binding Constant Between Sodium Houttuifonate and Human Serum Albumin by Capillary Electrophoresis

LIAN Chun-xia<sup>1</sup>, GAN Ting-ting<sup>1</sup>, CHEN Hua<sup>1</sup>, YUAN Pe<sup>2</sup>, XIA Zhi-ning<sup>1</sup>

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China;

2. Pharmaceutical Department, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** The binding constant between sodium houttuifonate(SH) and human serum albumin(HSA) was determined using the mobility shift model of capillary electrophoresis interaction analysis. Three different linear plotting methods, namely double reciprocal, y-reciprocal and x-reciprocal were used to measure the binding constant,  $4.072 \times 10^4$ ,  $3.845 \times 10^4$  and  $3.791 \times 10^4$  L/mol were obtained respectively. These results confirm that the interaction is strong, which can provide important information for further studying the transportation, distribution and activity of SH in human bodies.

**Key words:** sodium houttuifonate; human serum albumin; binding constant; capillary electrophoresis

(编辑 张 苹)