

巴氯芬及 β -环糊精的包结物与牛血清白蛋白的相互作用研究*

刘宇飞, 孙小梅, 王献, 李步海**

(中南民族大学化学与材料科学学院, 分析化学国家民委重点实验室, 武汉 430074)

摘要 目的: 研究巴氯芬及 β -环糊精的包结作用和巴氯芬及 β -环糊精包结物与牛血清白蛋白的相互作用。方法: 用紫外可见分光光度法与核磁共振法研究了 β -环糊精对巴氯芬的包结行为; 用摩尔比法确定了包结物的化学计量比; 用公式计算了不同温度下巴氯芬与 β -环糊精的包结常数; 用荧光光谱法研究了巴氯芬与包结物对牛血清白蛋白牛血清白蛋白的相互作用。结果: 巴氯芬与 β -环糊精的包结过程是自发的, 主要驱动力为疏水作用力; 巴氯芬及包结物都会对牛血清白蛋白产生静态猝灭。结论: 巴氯芬与 β -环糊精的包结比为 1:1; 巴氯芬与牛血清白蛋白的主要作用为疏水作用, 而包结物与牛血清白蛋白主要为静电作用, 这是由于 β -环糊精将巴氯芬分子中疏水部分包结的结果。

关键词: 巴氯芬; β -环糊精; 牛血清白蛋白; 包结; 静态猝灭; 光谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)04-0685-05

Interaction of baclofen or its complex of β -cyclodextrin with bovine serum albumin*

LIU Yu-fei, SUN Xiao-mei, WANG Xian, LI Bu-hai**

(Key Laboratory of Analytical Chemistry of the State Ethnic Affairs Commission, South-central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract Objective: The inclusion interaction of β -cyclodextrin and baclofen, and the interactions of bovine serum albumin and baclofen or complex were investigated. **Methods:** The inclusion interaction of β -cyclodextrin and baclofen was studied by UV spectra and ^1H NMR. The stoichiometry ratio for the formation of the inclusion complexes was determined by molar ratio method. The constants of baclofen and β -cyclodextrin at different temperatures were estimated according to the formula. The interactions of bovine serum albumin and baclofen or complex have been studied by fluorescence spectroscopy. **Results:** The result showed that the inclusion process was spontaneous, the hydrophobic force was main binding force of β -cyclodextrin inclusion complex; Both baclofen and complex could quench the fluorescence of bovine serum albumin. **Conclusion:** The stoichiometry ratio for the formation of the inclusion complexes is 1:1. The hydrophobic force of baclofen alone and bovine serum albumin is mainly interaction force, and the electrostatic force of inclusion compound and bovine serum albumin is mainly interaction force, for the reason that baclofen is included by the β -cyclodextrin.

Key words: baclofen; β -cyclodextrin; bovine serum albumin (BSA); inclusion; static quenching; spectroscopy

巴氯芬 [baclofen, 4-氨基-3-(4-氯苯)-丁酸], 是 γ -氨基丁酸(GABA)的脂溶性衍生物, 属神经递质。主要用于骨骼肌松弛, 神经性痉挛如多重硬化及外伤等。因其在治疗水平上副作用较小^[1], 自20世纪70年代以来国外一直广泛使用于脊髓损伤性痉挛患者。目前, 国外已将巴氯芬制成微球并通过动物实验取得了较好的效果^[2,3]。 β -环糊精由于其分子洞腔“外亲水, 内疏水”的特性,

可对很多疏水性药物进行包结形成环糊精包结物, 从而提高药物的溶解度和稳定性, 掩盖不良气味以及降低药物的刺激性与不良反应。这些特性使 β -环糊精及其衍生物成为广泛使用的药用辅料之一。对于 β -环糊精与巴氯芬间的作用, 以及巴氯芬与包结物对血清白蛋白的作用并未有人作过深入研究。本文主要研究 β -环糊精对巴氯芬的包结作用, 及巴氯芬和包结物对牛血清白蛋白间的作用, 可

* 国家自然科学基金项目(20705041)资助

** 通讯作者 Tel: 13807108031; E-mail: libh@mail.scuec.edu.cn

为进一步研究巴氯芬作为药物与蛋白质作用的机理打下基础。

1 仪器与试剂

UV-2550 型紫外可见分光光度计(日本岛津); Bruker-AV400 MHz 核磁共振谱仪(美国 Bruker 公司); PELS55 荧光光谱仪(英国 PE 公司); pH-3C 型精密酸度计(上海虹益仪表有限公司); SHZ-03 恒温水浴摇床(上海堪鑫仪器设备有限公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(上海东玺制冷仪器设备有限公司)。

巴氯芬(意大利 MSDS 公司); β -环糊精(中国医药上海化学试剂公司)二次重结晶; 牛血清白蛋白(美国 SIGMA 公司); 三羟甲基氨基甲烷 Tris Base(武汉及时雨科技有限公司); 超纯水。

2 实验方法

2.1 包结物的制备 将 250.0 mg β -环糊精溶于 20.0 mL 水中, 加入 21.4 mg 巴氯芬, 90 °C 磁力搅拌 4 h 即得包结物。将其定容至 100.0 mL。用紫外光谱法测定包结物及同浓度的巴氯芬溶液。将包结物溶液蒸干后用于核磁共振测定。

2.2 计算 β -环糊精对巴氯芬的包结比 参照文献[5], 运用摩尔比法, 测定其包结比。配制 $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 巴氯芬溶液, $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -环糊精溶液, 取一系列比色管, 均加巴氯芬溶液 1.0 mL, 依次加 β -环糊精溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 水定容至 10.0 mL。平衡 1 h 后, 测定 266 nm 处的紫外吸光度。

2.3 计算 β -环糊精对巴氯芬的包结常数 配制 $1.8 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -环糊精溶液, $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 巴氯芬溶液, 在有 1.0 mL 的巴氯芬溶液的比色管中, 依次加入 β -环糊精溶液 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 mL。平衡 1 h 后, 测定不同温度下的吸光度, 依据文献[6]的公式计算包结常数。

2.4 计算巴氯芬及包结物对牛血清白蛋白的作用常数 用 Tris·HCl 缓冲液(浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 用盐酸调至 pH 7.4, 含 NaCl 质量分数 1.8%) 配制牛血清白蛋白 $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 加入牛血清白蛋白溶液 1.0 mL 于比色管中, 加入不同体积的巴氯芬或包结物溶液(均含 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的巴氯芬), 再加入缓冲液 4.0 mL, 超纯水定容至 10.0 mL。在一定温度下测定其荧光强度(激发波长为 224 nm, 发射波长为 347 nm), 计算其包结常数。

3 结果与讨论

3.1 包结物的表征

3.1.1 紫外光谱 巴氯芬及包结物的紫外光谱见图 1。从图 1 中可以看出, 巴氯芬在 266 nm 处有一最大吸收峰。而其包结物的吸收峰的峰位没有改变, 但吸收强度明显增大, 分子基态性质的变化标示着包结物的形成, 而吸收峰的峰位不变, 则说明包结对巴氯芬的结构未产生影响, 包结反应是一个物理结合过程, 没有产生新的化学结构[8]。

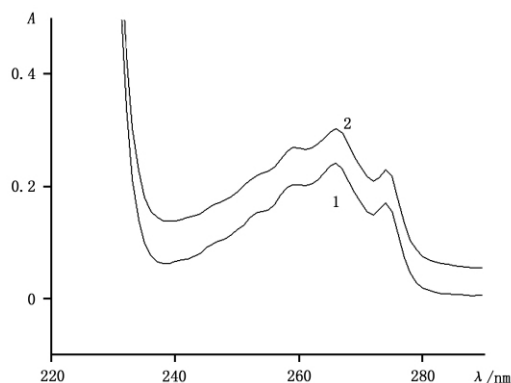


图 1 巴氯芬(1)及其包结物(2)的紫外吸收光谱

Fig 1 UV spectra of baclofen(1) and the complex(2)

3.1.2 包结物的核磁共振谱

以氘代水为溶剂, 将 β -环糊精、巴氯芬、包结物分别溶解以核磁共振谱表征。结果见表 1 和表 2。

表 1 β -环糊精与包结物的核磁共振化学位移对比

Tab 1 Comparison of the ^1H NMR δ between β -cyclodextrin and complex

	H(1)	H(2)	H(3)	H(4)	H(5)	H(6)
β -环糊精(β -cyclodextrin)	5.029	3.611	3.921	3.562	3.810	3.833
包合物(complex)	5.031	3.623	3.853	3.586	3.695	3.782
$\Delta\delta$	+0.002	-0.012	-0.068	+0.024	-0.115	-0.051

表 2 巴氯芬与包结物的核磁共振化学位移对比

Tab 2 Comparison of the ^1H NMR δ between baclofen and complex

	苯环-H (benzene ring-H)	α -H	β -H	γ -H
巴氯芬(baclofen)	7.380	3.312	3.197	2.594
包合物(complex)	7.399	3.354	3.283	2.633
$\Delta\delta$	+0.019	+0.042	+0.086	+0.039

从表 1 数据可以看出, 形成包结物后, β -环糊精孔腔内外质子的化学位移均发生不同程度的变化。且腔内质子 H(3)、H(5) 的化学位移变化大于腔外质子 H(2)、H(4) 和 H(6), 这说明巴氯芬已进入 β -环糊精的腔体内, 使 β -环糊精的腔内质子变化较大, 而腔外的质子变化较小。而 H(5) 的 $\Delta\delta$ 大于 H(3) 的 $\Delta\delta$, 且向高场方向移动, 这是由于 β -环

糊精的刚性圆锥形结构所致^[8]。

由表 2 可以看出,巴氯芬分子中各位置的氢也发生了变化,但由于主客体之间不存在化学变化,因而其变化位移都不大^[8]。

3.2 巴氯芬与 β -环糊精的包结比

改变 β -环糊精浓度,在巴氯芬的最大吸收波长 266 nm 处测定其吸光度,结果如图 2 所示。

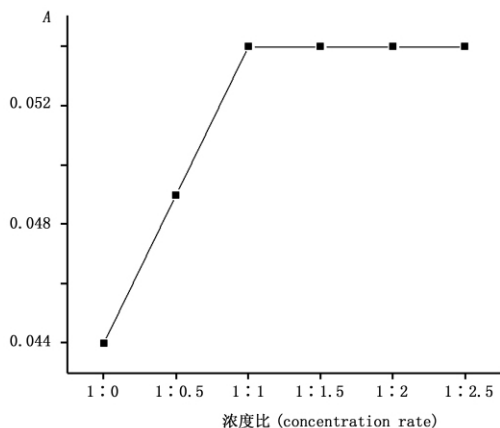


图 2 不同巴氯芬与 β -环糊精浓度比的紫外吸光度

Fig 2 Effect of various baclofen/ β -cyclodextrin (molar ratio) on UV absorption change at 266 nm

从图 2 可以看出,随着主客体浓度比的变化,溶液的吸光度增加。当主客体分子间进行包结配位时,由于 β -环糊精空腔中高电子云密度诱导作用,使得客体分子电子发生移动,客体分子紫外光谱的最大吸收波长位移或吸光度规律性递变^[8]。但当主客体浓度比到达 1:1 时,吸光度值开始稳定不变,表明巴氯芬与 β -环糊精形成了稳定的包结物。由此可以确定 β -环糊精与巴氯芬的包结比为 1:1。

3.3 包结常数的测定

为进一步研究包结作用,在不同温度下测定其包结常数。固定巴氯芬浓度,改变 β -环糊精浓度,测定巴氯芬的吸光度。按文献^[7]公式计算包结常数:

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta \varepsilon \cdot K \cdot [C]} \cdot \frac{1}{[CD]_0} + \frac{1}{\Delta \varepsilon \cdot [C]}$$

式中 ΔA 表示吸光度变化; $[CD]_0$ 表示 β -环糊精的浓度; $[C]$ 表示巴氯芬的总浓度; $\Delta \varepsilon$ 表示包结和未包结的巴氯芬的吸光系数差值。通过 $1/\Delta A$ 和 $1/[CD]_0$ 作图得直线,由截距和斜率求得包结常数 K
25 °C 时 $Y = 0.0938X + 0.4002$ $r^2 = 0.9944$ $K = 4.27 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$

30 °C 时 $Y = 0.0973X - 0.3044$ $r^2 = 0.9983$ $K = 3.89 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$

35 °C 时 $Y = 0.0941X + 0.3134$ $r^2 = 0.9972$ $K = 3.33 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$

3.4 包结过程的热力学焓变和熵变

已知 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, 且 $\Delta G = -RT \cdot \ln K$, 得 $\ln K = -\Delta H/R \cdot 1/T + \Delta S/R$

由包结常数的对数值对温度的倒数,即可计算出反应的焓变(斜率)和熵变(截距),所得结果见表 3。

表 3 不同温度下巴氯芬和 β -环糊精的包结常数与热力学参数

Tab 3 Constants and thermodynamic parameters of baclofen and β -cyclodextrin at different temperatures

T/K	$K/$ $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	ΔG $/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	ΔH $/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	ΔS $/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
298.15	4.27	-3.60	-273.30	51.21
303.15	3.89	-3.42		
308.15	3.33	-3.13		

从表 3 可以看到,在不同温度下的 ΔG 均小于 0,说明反应是可以自发进行的。焓变 ΔH 为负值,熵变 ΔS 为正,表示在包结过程中为放热反应且伴有熵增加的过程,且其主要作用力应为疏水作用^[14],这说明巴氯芬的非极性部分(即苯环部分)进入了 β -环糊精的内腔。

3.5 巴氯芬及包结物对牛血清白蛋白的作用

3.5.1 巴氯芬及包结物对牛血清白蛋白荧光猝灭

依照“2.4”项下方法测定在不同浓度下巴氯芬及包结物存在下的牛血清白蛋白荧光强度,所得结果如图 3。

从图 3 可以看出,随着巴氯芬及包结物浓度的增加,牛血清白蛋白的荧光强度逐渐降低,说明巴氯芬及其包结物均与牛血清白蛋白发生了作用,导致了荧光猝灭。

荧光猝灭过程通常有动态和静态猝灭之分。动态猝灭是猝灭剂与荧光体激发态分子之间的相互作用过程,遵从 Stern. Volmer 方程: $F_0/F = 1 + K_q \zeta_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q]$ ^[14], 式中 K_q 为 Stern. Volmer 猝灭常数, ζ_0 为无猝灭剂时生物大分子的平均寿命,通常取值 10^{-8} s , K_{sv} 为双分子猝灭过程速率常数。依据 Stern. Volmer 方程,对 F_0/F 和 $[Q]$ 进行线性回归,所得 Stern. Volmer 方程及猝灭常数见表 4。

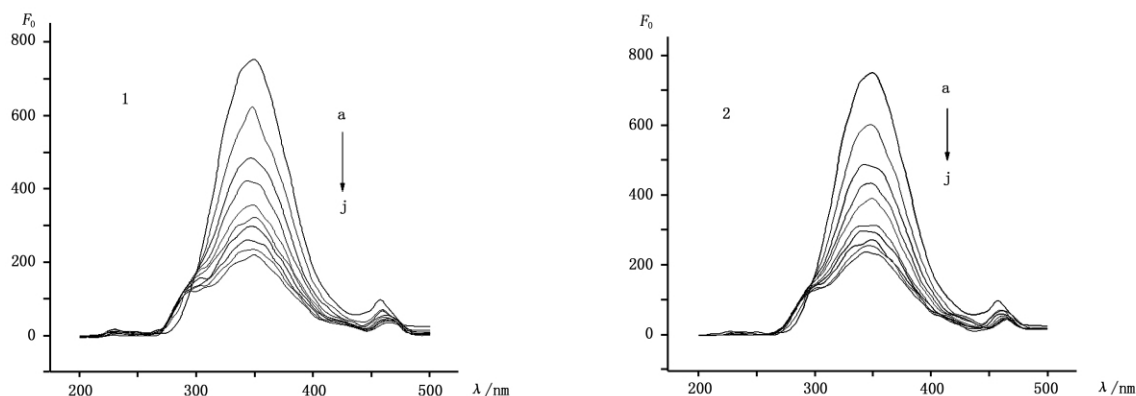


图3 巴氯芬(1)及包结物(2)对BSA荧光光谱的影响

Fig 3 Effect of baclofen (1) and complex (2) on the fluorescence spectra of BSA

 $C(\text{BSA}) = 0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $C(\text{baclofen or complex})$ mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ from a to j: 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45

表4 巴氯芬及包结物与BSA结合的Stern-Volmer常数和相应的直线关系

Tab 4 Stern-Volmer quenching constants of the system of BSA and baclofen or complex at different temperatures

化合物(compound)	Stern-Volmer 方程(equation)	r^2	$K_{sv}/\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	$K_q/\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
巴氯芬(baclofen)	$F_0/F = 5363 [Q] + 1$	0.9901	5363	5.36×10^{11}
包结物(complex)	$F_0/F = 4830 [Q] + 1$	0.9965	4830	4.83×10^{11}

由结果可知,在一定范围内,巴氯芬及包结物对BSA的荧光猝灭 Stern-Volmer 曲线均呈良好的线性关系,这是静态猝灭的迹象之一。由于各类猝灭剂对生物大分子最大扩散控制的碰撞猝灭常数为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,而这远小于巴氯芬及包结物对BSA的猝灭常数。这说明巴氯芬及包结物对BSA的荧光猝灭并非分子间动态猝灭所致,而是形成了复合物所引起的静态猝灭^[10,11]。

3.5.2 巴氯芬及包结物对牛血清白蛋白的结合常数与结合位点数的计算

表5 不同温度下巴氯芬及包结物对BSA的结合常数与结合位点数

Tab 5 Binding constants and binding sites of baclofen and complex at different temperatures

化合物(component)	25 °C		37 °C	
	$K_b/\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	r^2	$K_b/\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	r^2
巴氯芬(baclofen)	1.12×10^4	1.093 ~ 0.9953	1.4×10^4	1.108 ~ 0.9901
包结物(complex)	4.52×10^3	0.9896 ~ 0.9965	7.64×10^2	0.7703 ~ 0.9912

从表5可以看出,巴氯芬对BSA的结合常数和结合位点数都大于包结物的结合常数和结合位点数。这说明,由于 β -环糊精的包结作用,使得巴氯芬对BSA的作用减弱,起到了缓释的作用。通过不同温度下的结合常数,再可以求得巴氯芬及包结物对BSA的热力学参数,结果见表6。

表6表明,巴氯芬与包结物对BSA作用的 ΔG 均为负数,这说明反应均为自发反应。根据Ross总结的根据热力学常数的符号与大小要确定作用力的

按文献[1~13]公式:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log [Q]$$

可计算出巴氯芬及包结物在不同温度下与BSA的结合常数及结合位点数。式中, F_0 为空白BSA的荧光强度; F 为加入药物后的荧光强度; K_b 为结合常数; n 为结合位点数; $[Q]$ 为药物浓度;通过公式作图 $\lg [(F_0 - F)/F] \sim \lg [Q]$,从而得到线性方程。根据所得线性方程,得出巴氯芬及包结物与BSA的结合常数列于表5。

表6 巴氯芬及包结物对BSA的热力学参数

Tab 6 Thermodynamic parameters for the binding of baclofen and complex with BSA

	$T/^\circ\text{C}$	ΔG	ΔH	ΔS
		/kJ $\cdot \text{mol}^{-1}$	/kJ $\cdot \text{mol}^{-1}$	/kJ $\cdot \text{mol}^{-1}$
巴氯芬(baclofen)	25	-23.11	13.21	121.82
	38	-24.12		
包结物(complex)	25	-20.86	-1.58	50.11
	38	-17.17		

类型: $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ 为典型的疏水作用力; $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$ 时为氢键和范德华力; $\Delta H \approx 0$ 或较小, $\Delta S > 0$ 时为静电作用力; $\Delta H < 0$ 时, 静电作用力为主要作用力^[4]。因而可以看出, 未包结巴氯芬对 BSA 的主要作用力为疏水作用力, 其主要作用位点可能是巴氯芬的苯环部分(即疏水端)。而包结物则由于其疏水端被 β -环糊精包结, 故其主要作用力为静电作用力, 其作用部分可能是巴氯芬的氨基端和羧基端(即亲水部分)。

参考文献

- 1 Darlene R, Daniel J. Baclofen and ethanol ingestion: A case report. *J Emerg Med*, 1999, 17(6): 1
- 2 Frederic L, Nathalie F, Jean - CD, *et al.* Biopharmaceutics of intrathecal baclofen - loaded microparticles in a goat model. *Intern J Pharm*, 2005, 298: 68
- 3 Frederic L, Pascal R, Nathalie F, *et al.* Baclofen - loaded microspheres: preparation and efficacy testing in a new rabbit model. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 59: 449
- 4 JIN Xiao - jiang(金小江), ZHOU Jian - ping(周建平). The Characteristics of cyclodextrin/ drug inclusion complexes and the methods of determinating and predicting inclusion constant(环糊精包合特性及包合常数的测定和预测). *Prog Pharm Sci (药学进展)*, 2005, 29(11): 491
- 5 YAO Hong(姚虹), WEI Tai - bao(魏太保), XU Wei - xia(徐维霞), *et al.* UV spectroscopic characterization of the inclusion interaction of β -cyclodextrin and sym - diphenyl - thiourea and sym - diphenyl - urea(β -环糊精与二苯硫脲、二苯脲包结作用的紫外光谱研究). *Spectrosc Spectral Anal (光谱学与光谱分析)*, 2006, 26(9): 1664
- 6 HU Qian(胡倩), LIU Wei - jin(刘维锦). Preparation and characterization of inclusion complex of β -cyclodextrin with permethrin(氯菊酯- β -环糊精包合物的制备及表征). *Appl Chem Ind (应用化工)*, 2009, 38(5): 666
- 7 ZHANG Guo - li(张国丽), TANG Ke - wen(唐课文), HUANG Ke - long(黄可龙), *et al.* Inclusion mechanics between β cyclodextrin derivatives and α -cyclohexyl - mandelic acid by UV spectrophotometry(紫外光谱研究 β -环糊精衍生物与 α -环己基扁桃酸的包结作用). *Chin J Spectrosc Lab (光谱实验室)*, 2007, 24(2): 81
- 8 WANG Zhi - bin(王志斌), ZHAO Min(赵敏), LIAN Zhong - wei(梁中伟). Investigation of the self - assembled Inclusion behaviour of β -cyclodextrin and N, N' -bis(4 - pyridylmethyl) - 1, 6 - hexanediamine (β -环糊精与 N, N' -二(4 - 吡啶基甲基) - 1, 6 - 己二胺自组装包结行为的研究). *Acta Chim Sin (化学学报)*, 2006, 64(23): 2384
- 9 You JM, Lao WJ, Fan XJ, *et al.* Study of the chromatographic behavior and inclusion constants of new fluorescence agents by use of cyclodextrin additives under conditions of steady - and dynamic - state Equilibrium and with fluorescence detection. *Chromatographia*, 1999, 49(1/2): 95
- 10 Cui FL, Fan J, Li JP, *et al.* Interactions between 1 - benzoyl - 4 - p - chlorophenyl thiosemicarbazide and serum albumin: investigation by fluorescence spectroscopy. *Bioorgan Med Chem*, 2004, 12: 151
- 11 XUE Ling - wei(薛灵伟), PENG Qin - wei(彭勤龙), HAN Yong - jun(韩永军), *et al.* Synthesis of diselenide porphyrin dimer and its interaction with BSA (二硒卟啉的合成及其与牛血清白蛋白的相互作用). *Chin J Appl Chem (应用化学)*, 2009, 26(8): 909
- 12 D'áz X, Abuín E, Lissi E. Quenching of BSA intrinsic fluorescence by alkylpyridinium cations Its relationship to surfactant - protein association. *Photochem Photobiol A: Chem*, 2003, 155: 157
- 13 ZHANG Ye - zhong, DAI Jie, ZHANG Xiao - ping, *et al.* Studies of the interaction between Sudan I and bovine serum albumin by spectroscopic methods. *J Mol Struct*, 2008, 888: 152
- 14 YANG Zhao - xia(杨朝霞), WEN Yan - qing(文艳清), ZHANG You - yu(张友玉). Studies on the interaction of nobiletin and bovine serum albumin by spectral methods(川陈皮素与牛血清白蛋白相互作用的光谱研究). *J Anal Sci (分析科学学报)*, 2009, 25(5): 527

(本文于2010年7月7日收到)