

荧光光谱法研究奥美拉唑和埃索美拉唑 与牛血清白蛋白的相互作用

杨慧 王志群 王宇春 倪坤仪

(中国药科大学分析化学教研室 南京市童家巷 24 号 210038)

摘要 首次应用荧光光谱法研究外消旋体奥美拉唑和其中的一个单体 S-奥美拉唑(埃索美拉唑)分别与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用机制的异同。利用荧光猝灭反应求出了在 pH7.4、pH8.0、pH9.0 这三种环境中两个药物结合常数 K_A 和结合位点数 n , 进一步根据热力学参数判断出它们的主要作用力类型。发现两个药物引起的 BSA 内源荧光的猝灭均是由静态猝灭引起的。在相同情况下埃索美拉唑对 BSA 的结合能力强于奥美拉唑, 结合位点数都是 1。两种药物分子与 BSA 之间的作用力类型主要为疏水作用力和静电作用力。可以得出结论: 两个药物除了结合常数的差异外并无不同。

关键词 荧光光谱法, 奥美拉唑, 埃索美拉唑, 对映异构体, 牛血清白蛋白。

中图分类号: O 657.32 文献标识码: A 文章编号: 1004-8138(2008)03-0284-06

1 引言

奥美拉唑(Omeprazole, Ome), 作为英国 AstraZeneca 公司开发的世界上第一个质子泵抑制剂(PPD), 在治疗消化性胃溃疡和反食性胃炎已有近 20 年的历史, 在世界范围内得到了广泛的应用。它是由一对光学异构体组成的消旋体, 其中的左旋异构体因为药效更为显著, 也作为一种药物被命名为埃索美拉唑(Esomeprazole, Eso), 于 2001 年和 2002 年分别在欧洲和美国上市(见图 1)。研究表明 Eso 的抑酸作用较 Ome 更强更持久^[1], 对此有很多解释, 一般认为这是由于 Eso 首过效应小、血浆清除率低而全身生物利用率高所引起的^[2]。

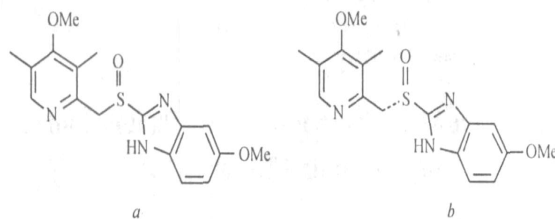


图 1 奥美拉唑(a)和埃索美拉唑(b)的化学结构式。

当不存在外部手性因素时, 对映体具有完全相同的化学和物理性质。构成生命体系的生物大分子及其大多数重要的构件仅以对映体的一种形态存在。生物活性的手性化合物, 例如药物, 与它的受体部位以手性的方式相互作用, 因此, 药物的两个对映体以不同的方式参与作用, 并可能导致不同的作用效果, 这已成为药物研究中的热点。

联系人, 电话: (025) 83310807; E-mail: wzqpu@126.com

作者简介: 杨慧(1982—), 女, 江苏省徐州市人, 硕士研究生, 研究方向: 生物大分子光谱研究。

收稿日期: 2007-12-03; 接受日期: 2007-12-29

血清白蛋白是血浆中含量最丰富的蛋白质,能结合、运输许多内源性和外源性化合物。药物自给药部位吸收进入血液循环后,与血清白蛋白结合,从血液转移到各组织器官。药物与白蛋白的结合能力影响到药物的作用效果。利用荧光法研究药物与白蛋白的相互作用,因为其灵敏度高、准确性强、操作简便受到越来越广泛的应用,对此已有了广泛的研究^[3,4]。

本文首次使用荧光光谱法比较了手性消旋体奥美拉唑(Ome)和它的左旋异构体埃索美拉唑(Eso)在不同pH环境下与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用,通过Stern-Volmer方程处理数据,发现两种药物分子引起的BSA荧光猝灭都是由静态猝灭引起的。分别求出了Ome和Eso的结合常数和结合位点数,发现不同pH下的结合常数有较大不同,且生理条件下Eso对白蛋白的结合能力大于Ome,血浆清除率降低,作用持续时间也较长。奥美拉唑和它的左旋异构体埃索美拉唑的白蛋白结合率的不同为二者药效的差异提供了另一种解释途径。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

RF5301型荧光光谱仪(日本Shimadzu公司)、1cm×1cm方型石英光谱池、UV-3100型紫外-可见分光光度计(日本Shimadzu公司)、pHS-25型酸度计(上海伟业仪器厂)。

牛血清白蛋白(BSA)(南京瑞创生物技术有限公司),用0.9%NaCl溶液配制成 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液,于冰箱中4℃保存;不同pH值的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 磷酸盐缓冲液。奥美拉唑和埃索美拉唑(上海有机所)。所用试剂均为分析纯,实验所用水均为二次蒸馏水。

2.2 实验方法

于1cm石英比色皿中准确移取2mL浓度为 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的牛血清白蛋白溶液,逐渐滴加微升量的奥美拉唑和埃索美拉唑溶液,混合平衡后以激发波长为280nm,入射、发射狭缝宽均为3nm,记录300—500nm的荧光光谱。固定激发和发射波长间隔 $\Delta\lambda$ 分别为15nm和60nm,记录同步荧光光谱。

3 结果与讨论

3.1 奥美拉唑和埃索美拉唑与BSA相互作用的荧光光谱的比较

由图2可以看到分别滴加奥美拉唑和埃索美拉唑后BSA的荧光猝灭光谱(pH7.4, 278K),随着奥美拉唑和埃索美拉唑浓度的增加,BSA的荧光被强烈猝灭。从两者的比较可以看出,它们都可以和BSA发生相互作用,但是埃索美拉唑的猝灭程度要更强一些。

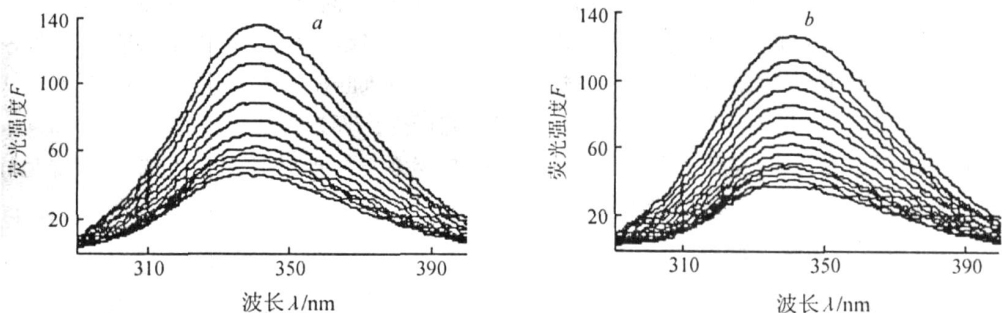


图2 奥美拉唑(a)和埃索美拉唑(b)对BSA的荧光猝灭光谱图

$C_{\text{BSA}} = 1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, C_{Ome} 和 $C_{\text{Eso}} = 0 \sim 5.3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2 荧光猝灭机理和猝灭常数

荧光猝灭分为动态猝灭、静态猝灭和非辐射能量转移猝灭等几类,动态猝灭主要是由于粒子间的碰撞引起的,而静态猝灭主要是由于猝灭剂与荧光物质形成了不发光的配合物引起的。动态猝灭过程可以由 Stern-Volmer 方程^[5]描述,

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

$$K_{sv} = K_q \tau_0 \quad (2)$$

其中: $[Q]$ ——猝灭体的浓度; K_{sv} ——Stern-Volmer 猝灭常数; K_q ——生物分子的猝灭速率常数; τ_0 ——不存在猝灭体时荧光体的荧光寿命,对于生物大分子约为 10^{-8} s^[6]。需要注意的是 Stern-Volmer 曲线为直线表明只存在一种猝灭方式,但并不一定是动态猝灭,它们二者主要以动态猝灭速率常数 K_q 和不同温度下的 K_{sv} 来区分。

假设猝灭是由动态猝灭引起的,根据公式(1),以 F_0/F 对 $[Q]$ 作图,得一直线,它的斜率就是 K_{sv} 。本实验考察了奥美拉唑和埃索美拉唑在偏碱性条件下 (pH 7.4—9.0) 温度 298K 和 310K 时的猝灭情况所得结果列于表 1。图 3 比较了在相同 pH 7.4 条件下,奥美拉唑和埃索美拉唑的 K_{sv} 及温度对它们的影响。

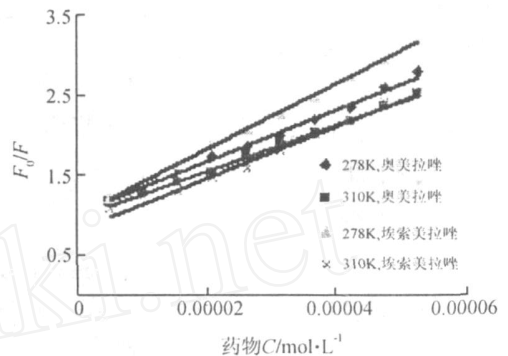


图 3 278K 和 310K 时奥美拉唑和埃索美拉唑对 BSA 猝灭的 Stern-Volmer 图

表 1 奥美拉唑和埃索美拉唑在不同温度、不同 pH 值下对 BSA 的 Stern-Volmer 猝灭常数 K_{sv} 和相关系数 r

温度	奥美拉唑			埃索美拉唑			
	pH 7.4	pH 8.0	pH 9.0	pH 7.4	pH 8.0	pH 9.0	
298K	$10^4 K_{sv} / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	3.31	3.77	2.48	4.18	5.03	4.26
	r	0.9975	0.9978	0.9995	0.9990	0.9992	0.9991
310K	$10^4 K_{sv} / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	2.88	3.08	2.32	3.46	4.35	4.02
	r	0.9979	0.9958	0.9962	0.9958	0.9992	0.9976

在偏碱性条件下,奥美拉唑和埃索美拉唑的 Stern-Volmer 曲线均呈现较好的线性关系。由公式(2)可计算出 pH 7.4 条件下奥美拉唑的猝灭速率常数 K_q 是 $3.31 \times 10^{13} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,埃索美拉唑的 K_q 是 $4.18 \times 10^{13} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,这都远远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大动态猝灭速率常数 $2.0 \times 10^{10} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,因此可以初步判断这两种药物与 BSA 的猝灭不是动态猝灭过程。而且随着温度的升高,它们的 K_{sv} 都随之减小,可以进一步判断出这两种药物对 BSA 的猝灭都属于静态猝灭效应。在 pH 8.0—9.0 条件下也可以看到它们的猝灭方式都是静态猝灭。

由此可以得出结论,在偏碱性条件下,奥美拉唑和埃索美拉唑对 BSA 的荧光猝灭都是静态猝灭,即与 BSA 之间形成了配合物,二者没有区别。

3.3 结合位点数 n 和结合常数 K_A 的计算

在静态猝灭中,结合常数和结合位点数可以通过双对数公式求出^[7]。设生物大分子有 n 个相同且独立的结合位置,可以通过公式推导得到

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_A + n \lg [Q] \quad (3)$$

根据公式(3)以 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg [Q]$ 作图,通过斜率和截距求出药物分子与蛋白质分子的

结合常数 K_A 和结合位点数 n 。所得结果列于表 2。

表 2 奥美拉唑和埃索美拉唑在不同温度、不同 pH 值下与 BSA 的结合常数 K_A 和结合位点数 n

温度		奥美拉唑			埃索美拉唑		
		pH7.4	pH8.0	pH9.0	pH7.4	pH8.0	pH9.0
298K	$10^4 K_A / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	3.09	10.0	4.39	5.37	10.7	6.31
	n	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0
310K	$10^4 K_A / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	2.51	7.08	2.09	4.37	9.55	2.34
	n	1.0	1.1	1.0	1.0	1.1	0.9

由所得结果可以判断, 奥美拉唑和埃索美拉唑与 BSA 相互作用的结合位点数 n 都是 1, 但是埃索美拉唑的结合常数 K_A 在各 pH 条件下都要大于奥美拉唑, 表明左旋的奥美拉唑与 BSA 的结合能力要强于其混旋体。在三种 pH 条件下, 这两种药物都是在 pH8.0 条件下的 K_A 值最大。这可能是因为牛血清白蛋白与药物有着专一的结合位点, 它们的结合是特异性的, 埃索美拉唑的结构特点可以使它更便于与 BSA 的结合。埃索美拉唑与 BSA 更强的结合能力使得 BSA 能更充分地发挥其血药调节能力, 更加持久的保持稳定的血药浓度, 达到更好的治疗效果。

3.4 药物与 BSA 之间作用力类型的判断

药物等有机小分子和蛋白质等生物大分子常常借助于疏水作用力、静电引力、氢键、立体排斥力和 van der Waals 力等结合形成超分子复合物^[8]。利用公式(4)、(5)可以计算焓变 ΔH 和熵变 ΔS , 进而得到不同温度下反应的自由能 ΔG 。一般在温度变化不大的情况下可以把反应的焓变 ΔH 看作一个常数, 根据热力学参数, 可以计算出不同温度下反应的自由能 ΔG 、焓变 ΔH 和熵变 ΔS 。

$$\ln(K_2/K_1) = (1/T_1 - 1/T_2) \Delta H / R \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S = -RT \ln K \quad (5)$$

由前面所得数据 K_A 根据公式(4)、(5)计算, 把 pH7.4 情况下的结果列于表 3。

表 3 奥美拉唑和埃索美拉唑与 BSA 作用的相关热力学参数

	奥美拉唑		埃索美拉唑	
	298K	310K	298K	310K
$\Delta H / (\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	0.537		0.533	
$\Delta G / (\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	-26.1	-25.6	-27.5	-27.0
$\Delta S / (\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	85.9	87.7	90.5	92.3

不同的药物与蛋白质的主要作用力类型是不同的。Ross 等^[9]根据大量的实验结果总结出判断生物大分子与小分子结合性质的热力学规律, 即: $\Delta S > 0$ 可能是疏水和静电作用力; $\Delta S < 0$ 可能为氢键和范德华力; $\Delta H > 0, \Delta S > 0$ 为典型的疏水作用力; $\Delta H < 0, \Delta S < 0$ 为氢键和范德华力; $\Delta H = 0$ 或较小, $\Delta S > 0$ 为静电作用力; $\Delta H < 0$ 时静电作用力为主要作用力。

由表中数据判断在生理条件下这两种药物与 BSA 之间的作用力都是疏水作用力和静电作用力的共同作用, 并没有区别。

3.5 药物对 BSA 构象的影响

使用同步荧光光谱可以探测蛋白质中酪氨酸(Tyr)和色氨酸(Trp)微环境的改变。由 $\Delta\lambda = \lambda_m - \lambda_{ex} = 15\text{nm}$ 作同步荧光光谱显示 Tyr 残基的光谱特征, $\Delta\lambda = \lambda_m - \lambda_{ex} = 60\text{nm}$ 同步荧光光谱显示 Trp 残基的光谱特征^[10]。图 4 中的 a、b 分别是 $\Delta\lambda = 60\text{nm}$ 和 15nm , pH7.4, 298K 时与埃索美拉唑相互作用的 BSA 同步荧光光谱图。

从图中可以看出, 随着埃索美拉唑的浓度逐渐增加, Trp 和 Tyr 的最大荧光发射波长强度快速降低, Trp 的发射波长基本保持不变, 但是 Tyr 的发射波长明显蓝移, 这表明药物与对氨基酸残基

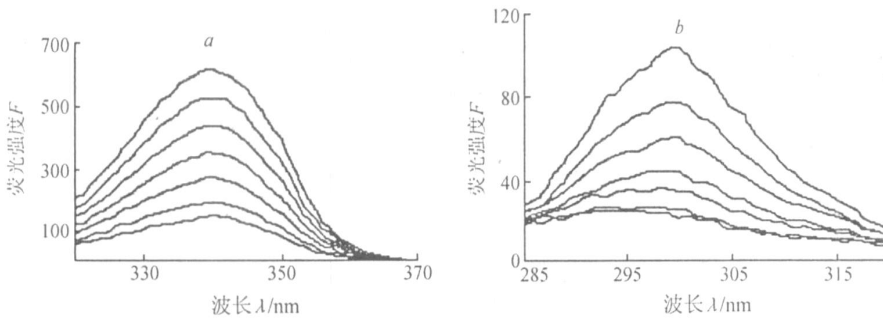


图 4 加入埃索美拉唑后 BSA 的同步荧光光谱

a —— $\Delta\lambda=60\text{nm}$; b —— $\Delta\lambda=60\text{nm}$

$C_{\text{BSA}} = 1 \times 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{Eso}} = 0 \sim 3.2 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

所处的微环境产生了一定影响,与 BSA 发生了结合。奥美拉唑也发现了相同的现象。

BSA 其空间结构由 3 个结构域组成,每个结构域由 2 个亚结构域以槽口相对的方式形成圆筒状结构,几乎所有的疏水性氨基酸残基都包埋在圆筒内部,构成疏水腔^[11]。加入药物之后 Tyr 发射波长的蓝移,说明奥美拉唑和埃索美拉唑可以进入 BSA 疏水腔中与之结合。虽然对 Trp 影响不大,但使 Tyr 所处微环境的极性有所增强,可能分布在分子表面附近的亲水区内,导致形成了一种新的无序结构。

奥美拉唑和埃索美拉唑是弱碱性物质,在 pH 7.4 的条件下都是以离子形式存在,影响了它们进入疏水腔,降低了结合常数。在 pH 9.0 的条件下都是以分子状态存在,与 BSA 的静电力作用降低也影响了结合常数。综合上面两点在 pH 8.0 的条件下最有利于药物与 BSA 的相互作用。埃索美拉唑的结构使得它可以更方便地进入疏水腔中,得到更大的结合常数。BSA 的构象和结合位点的惟一性使它对结合的药物产生了手性选择,结果是奥美拉唑的左旋体埃索美拉唑对 BSA 的结合能力要强于混旋体奥美拉唑。

参考文献

- [1] Lind T, Rydberg L, Kyleback A *et al*. Esomeprazole Provides In-Provedacid Control Versus Omeprazole in Patients with Symptoms of Gastro-Oesophageal Reflux Disease[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2000, **14**(7): 861—867.
- [2] Klotz U, Schwab M, Treiber G. CYP2C19 Polymorphism and Proton Pump Inhibitors[J]. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 2004, **95**(1): 2—8.
- [3] Matyus L, Szolbasi J, Jenei A. Steady-State Fluorescence Quenching Applications for Studying Protein Structure and Dynamics[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2006, **83**(3): 223—236.
- [4] Larissa AM, Anthony LF. Fluorescence as a Method to Reveal Structures and Membrane-Interactions of Amyloidogenic Proteins[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, **1768**(8): 1862—1885.
- [5] 许金钧,王尊本. 荧光分析法[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2006. 66—68.
- [6] Lakowicz JR, Weber G. Quenching of Fluorescence by Oxygen, A Probe for Structural Fluctuations in Macromolecules[J]. *Biochemistry*, 1973, **12**(21): 4161—4170.
- [7] 冯喜增,白春礼,林璋等. 吡啶橙与牛血清白蛋白的相互结合作用[J]. 分析化学, 1998, **26**(2): 154—157.
- [8] Klotz IM, Uquhart JM. Effect of Temperature on Binding of Organic Ions by Proteins[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, **71**(3): 847—865.
- [9] Ross D P, Subramanian S. Thermodynamic of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability[J]. *Biochemistry*, 1981, **20**(11): 3096—3099.
- [10] 肖厚荣,盛良全,施春华等. 水杨酸与牛血清蛋白相互作用的荧光光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, **24**(1): 78—81.

[11] 张宝林, 王文清, 白凤莲 葱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

Study on the Interaction between Omeprazole, Esomeprazole and Bovine Serum Albumin by Fluorescence Spectrophotometry

YANG Hui WANG Zhi-Qun WANG Yu-Chun NI Kun-Yi

(Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, P. R. China)

Abstract The interaction between enantiomeric pairs Omeprazole (Ome), S-omeprazole (Esomeprazole, Eso) and bovine serum albumin (BSA) were studied by fluorescence spectra. At the condition of pH 7.4, 8.0, 9.0, each binding constants K_A and the binding sites n were obtained by fluorescence quenching. The thermodynamic parameters were calculated to judge the main sorts of binding force. Fluorescence quenching of BSA by both Ome and Eso is deduced by static quenching. The binding constants of Eso were greater than Ome, both their number of binding sites were 1. The main sorts of binding force were both hydrophobic force and electrostatic force. Ome and Eso have no differences except the binding constants.

Key words Fluorescence Spectroscopy, Omeprazole, Esomeprazole, Enantiomer, Bovine Serum Albumin.

廉价光谱分析资料讯息

1. 《光电光谱分析》, 周开亿主编, 4 册, 16 开, 1236 页, 《光谱实验室》编辑部增刊, 每套 110 元。买 2 送 1。
2. 《光谱实验室》2004 年 1—6 期, 16 开, 1248 页, 每套 75 元。
3. 《数理统计在化学、光谱分析中的应用》, 纳利莫夫著, 余生等译, 《光谱实验室》编辑部编, 16 开, 396 页, 每册 10 元。
4. 《空心阴极放电及其应用》, 周开亿主编, 《真空科学与技术》杂志社出版, 32 开, 798 页, 上下册, 每套 10 元。
5. 《邮票上的光谱学和化学史》, 周开亿等编, 《科学出版社》1991 年出版, 16 开, 158 页, 附有 67 个国家和地区的彩色邮票(复印件, 下同) 176 枚, 每册 10 元。
6. 《邮票上的化学、光学和光谱学史》, 周开亿主编, 《光谱实验室》2006 年第 1 期彩色抽印本(收藏本), 16 开, 64 页, 附有 77 个国家和地区的彩色邮票 314 枚, 每册 30 元。买 3 送 1。
7. 《邮票上的科学家——佼佼者之路》, 周开亿主编, 《光谱实验室》2007 年第 1 期彩色抽印本(珍藏本), 16 开, 196 页, 附有 91 个国家和地区的彩色邮票 533 枚, 每册 70 元。买 3 送 1。
8. 《邮票上的杰出科学家》, 周开亿主编, 《光谱实验室》2008 年第 1 期彩色抽印本(珍藏本), 16 开, 240 页, 附有 104 个国家和地区的彩色邮票 515 枚, 每册 90 元。买 5 送 1。

以上各书售价中均含普通印刷品邮费。

联系地址: 北京市 81 信箱 66 分箱《光谱实验室》编辑部联络处 刘建林, 邮编: 100095