

# 荧光光谱法测定黄芪甲苷及环黄芪醇 与牛血清白蛋白相互作用

罗志强, 张玉杰, 孙青, 魏宝红, 刘星, 王雄飞, 袁瑞娟\*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

**[摘要]** **目的:**采用荧光光谱法研究黄芪甲苷及环黄芪醇与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用机制。**方法:**固定 BSA 浓度,依次加入不同浓度的黄芪甲苷或环黄芪醇,扫描其荧光猝灭光谱及同步荧光光谱。**结果:**黄芪甲苷和环黄芪醇均能对 BSA 的荧光发生淬灭,猝灭类型属于静态猝灭;在 293 K 下,黄芪甲苷和环黄芪醇与 BSA 的结合常数分别为  $1.35 \times 10^4$ ,  $8.51 \times 10^4$   $L \cdot mol^{-1}$ ,结合位点数  $n$  分别为 0.726 4, 0.731 2,在 310 K 温度下,二者与 BSA 的结合常数均略有下降。二者与 BSA 的结合过程均属于焐变小于零、熵变大于零、吉布斯自由能小于零的自发过程,与 BSA 的作用力类型为静电作用为主。同步荧光光谱显示二者均对色氨酸残基构象产生影响,对酪氨酸残基构象影响较小。**结论:**本实验阐明了黄芪甲苷和环黄芪醇与牛血清白蛋白的作用机制,为其进一步用药提供了理论依据。

**[关键词]** 黄芪甲苷; 环黄芪醇; 牛血清白蛋白; 荧光光谱; 作用机制

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0123-05

**[doi]** 10.11653/syjf2013160123

## Fluorescence Spectroscopic Studies on Interaction of Astragaloside IV and Cycloastragenol with Bovine Serum Albumin

LUO Zhi-qiang, ZHANG Yu-jie, SUN Qing, WEI Bao-hong, LIU Xing, WANG Xiong-fei, YUAN Rui-juan\*

(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**[Abstract]** **Objective:** To clarify the interaction mechanism of astragaloside IV and cycloastragenol with bovine serum albumin (BSA) by fluorescence spectroscopy. **Method:** Scanning the fluorescence quenching and synchronous spectrum through adding astragaloside IV and cycloastragenol to the solution of BSA. **Result:** The fluorescence quenching mechanism of astragaloside IV and cycloastragenol was static quenching. Under 293 K, the binding constants ( $K_A$ ) of astragaloside IV and cycloastragenol were  $1.35 \times 10^4$  and  $8.51 \times 10^4$   $L \cdot mol^{-1}$ , respectively. And the numbers of binding sites were 0.726 4 and 0.731 2, respectively. Under 310 K, the binding constants of astragaloside IV and cycloastragenol were both decreased. The thermodynamic parameters of astragaloside IV and cycloastragenol with BSA were  $\Delta H < 0$ ,  $\Delta S > 0$ , and  $\Delta G < 0$ , the interaction of astragaloside IV and cycloastragenol with BSA were driven mainly by electrostatic interaction. The results of synchronous spectrum showed that both the astragaloside IV and cycloastragenol affected the space conformation of tryptophane. But the space conformation of tyrosine was not affected by astragaloside IV and cycloastragenol. **Conclusion:** The interaction mechanism of astragaloside IV and cycloastragenol with BSA was clarified by fluorescence spectroscopy. It can supply theoretical supports for the rational administration of astragaloside IV and cycloastragenol.

**[Key words]** astragaloside IV; cycloastragenol; bovine serum albumin (BSA); fluorescence spectroscopy; interaction mechanism

**[收稿日期]** 20130109(023)

**[基金项目]** 教育部大学生创新性实验计划项目(201210026034)

**[第一作者]** 罗志强, E-mail: lzq4y3r@126.com

**[通讯作者]** \*袁瑞娟, 博士, 从事中药药效物质基础及中药质量控制研究, Tel: 010-84738619, E-mail: rjyuan@ yahoo.com.cn

黄芪甲苷 (astragaloside IV) 是中药黄芪的代表性皂苷成分,具有免疫调节、抗氧化、抗缺血性脑损伤、抗衰老和促智等作用。而环黄芪醇 (cycloastragenol) 是黄芪甲苷的皂苷元,研究发现黄芪甲苷和环黄芪醇可以通过激活端粒酶达到延缓衰老的作用<sup>[1]</sup>。黄芪甲苷在人体肠道菌群作用下部分代谢为环黄芪醇,大鼠灌胃给予黄芪甲苷后,在大鼠尿液中同时检测到黄芪甲苷和环黄芪醇,说明黄芪甲苷及环黄芪醇共同在体内发挥作用<sup>[2-3]</sup>。二者进入体内后,首先竞争性地与血浆蛋白结合,然后分布到各个部位发挥药效。目前,二者与血浆蛋白结合的情况尚未见报道,因此本文运用荧光光谱法测定黄芪甲苷和环黄芪醇与牛血清白蛋白的相互作用,以阐明黄芪甲苷和环黄芪醇在人体内的运输和作用机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 仪器与试剂** LS45 荧光分光光度计 (PerkinElmer), pH S-3C 型酸度计 (上海伟业仪器厂), CU420 型电热恒温水箱。

牛血清白蛋白 (BSA, Sigma), 黄芪甲苷及环黄芪醇 (北京美迪克斯生物技术有限公司, 纯度 > 98%), 其他试剂为国产分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

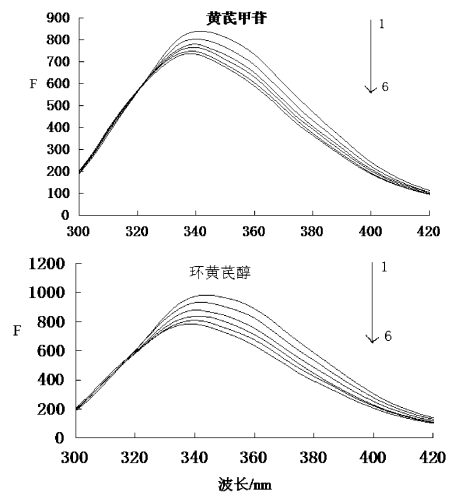
**1.2 溶液配制** 缓冲溶液: 67 mmol·L<sup>-1</sup> pH 7.4 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液; BSA 溶液: 精密称取 67 mg BSA, 溶解于 10 mL 缓冲溶液中即得; 黄芪甲苷储备液: 精密称取 8 mg 黄芪甲苷, 溶解于 250 mL 缓冲溶液中即得; 环黄芪醇储备液: 精密称取 5 mg 环黄芪醇溶于 250 mL 缓冲溶液中即得。

**1.3 测定方法** 在 1 cm 比色皿中, 加入 3 mL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲溶液和 5 μL BSA 溶液, 混合均匀后, 向其中分次加入黄芪甲苷或环黄芪醇溶液, 每次 2 μL, 混合均匀并分别置于 293, 310 K 的环境下测量。激发波长 280 nm, 荧光光谱扫描范围 300 ~ 500 nm, 同时记录 Δλ = 15, 60 nm 的同步荧光光谱。

## 2 结果与讨论

**2.1 黄芪甲苷和环黄芪醇对 BSA 的荧光猝灭光谱**  
向 BSA 溶液中, 分别加入不同体积的黄芪甲苷或环黄芪醇溶液, 扫描其荧光光谱图, 结果见图 1。在 280 nm 的激发波长下, BSA 的最大荧光发射波长为 345 nm。由于蛋白质中含有色氨酸及酪氨酸, 使其具有内源性荧光, 随着黄芪甲苷和环黄芪醇浓度的增大 (1 ~ 6), BSA 内源性荧光强度有规律的降低,

这说明黄芪甲苷和环黄芪醇与 BSA 之间发生了相互作用, 使 BSA 的荧光发生了猝灭。



$$C_{BSA} = 1.67 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1},$$

$$C_{\text{astragaloside IV}} = (2.67 \sim 16.02) \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1},$$

$$C_{\text{cycloastragenol}} = (2.67 \sim 16.02) \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

图 1 黄芪甲苷和环黄芪醇对 BSA 的荧光猝灭光谱 (T = 293 K)

## 2.2 黄芪甲苷和环黄芪醇对 BSA 荧光猝灭机制研究

**2.2.1 猝灭类型的确定** 根据猝灭机制不同可将荧光猝灭过程分为动态猝灭和静态猝灭。静态猝灭是指猝灭剂分子与荧光物质分子之间形成了新的复合物, 一般来说所生成的新复合物弱荧光或不发荧光; 而动态猝灭是猝灭剂分子与荧光分子的激发态分子之间的相互碰撞而导致的荧光猝灭, 它遵循 Stern-Volmer 方程<sup>[4]</sup>:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q]$$

式中  $F_0$  和  $F$  分别为未加入猝灭剂和加入猝灭剂的荧光强度;  $[Q]$  为猝灭剂的浓度;  $K_q$  为双分子猝灭过程速率常数;  $\tau_0$  为猝灭剂不存在时荧光分子平均寿命 (生物大分子的荧光寿命约为 10 ns<sup>[5]</sup>);  $K_{SV}$  为动态猝灭常数。

假设上述黄芪甲苷和环黄芪醇对 BSA 的荧光猝灭属于动态猝灭方式, 则它们与 BSA 的作用过程符合上述 Stern-Volmer 方程。以  $(F_0 - F)/F$  对  $[Q]$  作图, 不同温度下的 Stern-Volmer 曲线见图 2, 并对实验数据线性拟合得到  $K_{SV}$  和  $K_q$ , 结果见表 1。

表 1 不同温度下黄芪甲苷和环黄芪醇对 BSA 的猝灭常数

成分	T/K	$K_q/\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$K_{SV}/\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	$R^2$
黄芪甲苷	293	$8.70 \times 10^{13}$	$8.70 \times 10^5$	0.997 3
	310	$8.26 \times 10^{13}$	$8.26 \times 10^5$	0.999 3
环黄芪醇	293	$1.12 \times 10^{15}$	$1.12 \times 10^7$	0.998 1
	310	$9.30 \times 10^{14}$	$9.30 \times 10^6$	0.992 2

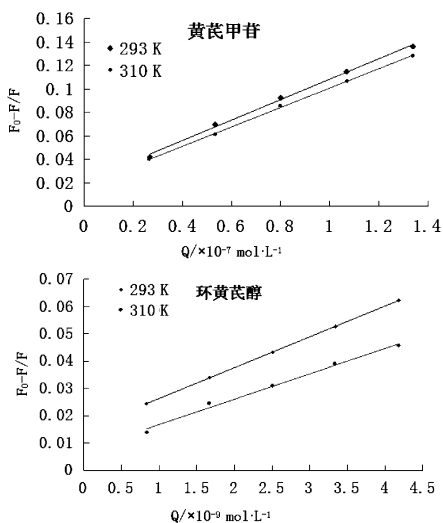


图2 黄芪甲苷和环黄芪醇与BSA的Stem-Volmer方程曲线

一般认为,动态猝灭常数随温度的升高而增大,而静态猝灭常数随温度的升高而减小,且各类猝灭剂对生物大分子的最大动态猝灭速率常数为  $2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  [6]。由图2和表1可知黄芪甲苷和环黄芪醇  $K_q$  数量级分别在在  $10^{13} \sim 10^{14}$  和  $10^{14} \sim 10^{15}$ ,且其值均是随温度升高而下降,故可初步判断黄芪甲苷和环黄芪醇对BSA荧光猝灭过程都是以静态猝灭为主的。

**2.2.2 黄芪甲苷与BSA的表观结合常数及结合位点数** 对于静态猝灭,结合位点  $n$  与结合常数  $K_A$  可用Lineweaver-Burk双倒数方程计算出[7]:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_A + n \lg [Q]$$

黄芪甲苷和环黄芪醇在温度293,310 K条件下对BSA荧光猝灭的双对数拟合曲线见图3,结合位点数及结合常数见表2。

表2 不同温度下黄芪甲苷和环黄芪醇与BSA的表观结合常数  $K_A$  及结合位点数  $n$

成分	T/K	$K_A/\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	$n$	$R^2$
黄芪甲苷	293	$1.35 \times 10^4$	0.726 4	0.999 8
	310	$1.22 \times 10^4$	0.725 9	0.995 5
环黄芪醇	293	$8.51 \times 10^4$	0.731 2	0.995 0
	310	$6.06 \times 10^4$	0.730 6	0.996 8

在293,310 K时黄芪甲苷与BSA结合位点数  $n$  分别是0.726 4,0.725 9,环黄芪醇与BSA结合位点数  $n$  分别是0.731 2,0.730 6,说明黄芪甲苷和环黄芪醇与BSA之间具有较强的结合作用,蛋白质能够用来运输和储存黄芪甲苷和环黄芪醇。此外,随着温度的升高,环黄芪醇和黄芪甲苷结合常数也均有

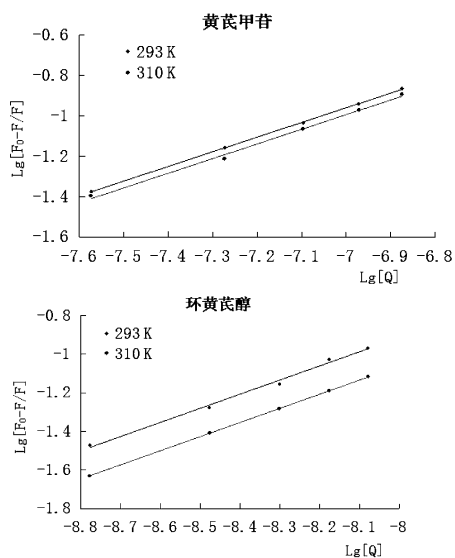


图3 黄芪甲苷和环黄芪醇与BSA的Lineweaver-Burk双倒数方程曲线

所减小,生成新的复合物稳定性也均随温度升高而下降,间接地说明了该猝灭过程均为静态猝灭。由表2可知,环黄芪醇的结合常数大于黄芪甲苷,可能是由于环黄芪醇较黄芪甲苷空间位阻小,更有利于与BSA相结合;此外,药物与蛋白结合受药物疏水性的影响,黄芪甲苷变为环黄芪醇后,疏水性增强,更易于进入BSA的疏水空间,从而与BSA形成结合物。槲皮素和芦丁与BSA的相互作用中也发现了类似的结果[8]。

**2.2.3 黄芪甲苷和环黄芪醇与BSA的作用力类型的确定** 药物小分子与生物大分子之间的结合力包括氢键、范德华力、静电作用力、疏水作用力等。药物不同,与蛋白质作用力类型也不同。根据反应前后热力学焓变  $\Delta H$  和熵变  $\Delta S$  的相对大小,可以判断药物与蛋白质之间的主要作用力的类型[8]。当温度变化不大时,反应的焓变  $\Delta H$  可以看作一个常数,有公式:

$$\Delta G = -RT \ln K, \Delta H = R \ln(K_2/K_1) / (1/T_1 - 1/T_2),$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G) / T$$

根据两个温度下的热力学常数值可以计算出黄芪甲苷和环黄芪醇与BSA相互作用的热力学函数值,结果见表3。

从表3可以看出,黄芪甲苷和环黄芪醇与BSA结合过程属于  $\Delta H < 0, \Delta G < 0, \Delta S > 0$ ,即熵增,吉布斯自由能减小的自发放热过程。由Ross生物大分子与小分子结合力性质规律判断[9],黄芪甲苷和环黄芪醇与BSA的相互作用力以静电作用力为主。

**2.2.4 黄芪甲苷和环黄芪醇对BSA中色氨酸和酪**

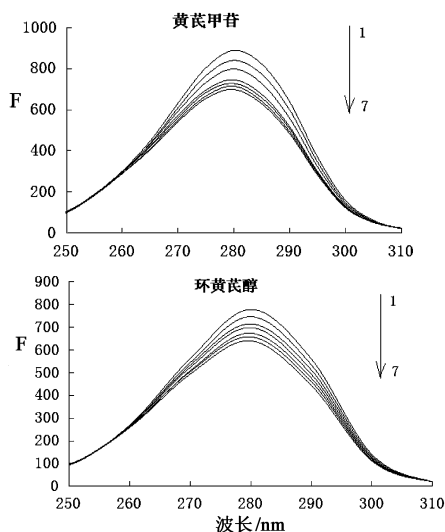
表 3 黄芪甲苷和环黄芪醇与 BSA 在不同温度下的猝灭常数及热力学参数

成分	T/K	$K_A$ /L·mol <sup>-1</sup>	$\Delta H$ /kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta G$ /kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta S$ /J·mol <sup>-1</sup> ·K <sup>-1</sup>
黄芪甲苷	293	$1.35 \times 10^4$	-4.44	-23.17	63.92
	310	$1.22 \times 10^4$		-24.25	
环黄芪醇	293	$8.51 \times 10^4$	-15.11	-27.65	42.80
	310	$6.06 \times 10^4$		-28.38	

氨酸残基构象的影响 在 20 多种氨基酸中,只有色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸有天然荧光,它们的相对荧光强度比是 100:9:0.5,因此蛋白质的内源荧光主要由色氨酸残基产生的。色氨酸和酪氨酸的荧光最大发射波长分别为 348,303 nm,而 BSA 的最大发射波长为 345 nm,因此色氨酸残基产生的荧光对 BSA 的荧光光谱起决定性作用。在同步荧光光谱中, $\Delta\lambda = 60$  nm 的同步荧光光谱图表现出色氨酸残基的光谱特性, $\Delta\lambda = 15$  nm 的同步荧光光谱图表现出酪氨酸残基的光谱特性。本实验选择  $\Delta\lambda = 60, 15$  nm,固定 BSA 浓度,逐步加入不同浓度的黄芪甲苷和环黄芪醇,测定 BSA 中色氨酸和酪氨酸残基的同步荧光光谱。 $\Delta\lambda = 60$  nm 的同步荧光图谱显示(图 4),随着黄芪甲苷或者环黄芪醇浓度增加,BSA 的荧光强度有规律的降低,且最大荧光发射波长有少许蓝移,这表明黄芪甲苷或者环黄芪醇的加入使色氨酸残基所处微环境发生改变,疏水性稍微降低<sup>[10]</sup>。 $\Delta\lambda = 15$  nm 的同步荧光图谱显示,随着黄芪甲苷或环黄芪醇浓度的增加,BSA 的荧光强度及峰位置基本不变,说明黄芪甲苷或者环黄芪醇对 BSA 中酪氨酸残基的微环境基本没有影响。由于 BSA 的荧光光谱主要是由色氨酸产生,而色氨酸在 BSA 的 582 个氨基酸残基中只有 2 个,分别位于 134,212 位,因此该实验只能说明对色氨酸和酪氨酸残基的构型影响,黄芪甲苷和环黄芪醇也可能与其他氨基酸残基发生结合,但不能通过改变环境而间接影响到色氨酸或者酪氨酸的荧光性质。

### 3 结论

本文运用荧光光谱法研究了黄芪甲苷和环黄芪醇与 BSA 的相互作用。研究表明,二者均能够与 BSA 发生结合,使 BSA 的荧光发生猝灭,猝灭类型为静态猝灭。黄芪甲苷和环黄芪醇与 BSA 发生竞争结合,黄芪甲苷的结合常数小于环黄芪醇的结合常数。热力学参数表明,二者与 BSA 的结合属于焓变  $\Delta H < 0$  和熵变  $\Delta S > 0$  的过程,与 BSA 之



$$C_{BSA} = 1.67 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1},$$

$$C_{astragaloside IV} = (2.67 \sim 16.02) \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1},$$

$$C_{cycloastragenol} = (2.67 \sim 16.02) \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

图 4 黄芪甲苷和环黄芪醇与 BSA 的同步荧光光谱图( $\Delta\lambda = 60$  nm)

间主要靠静电作用力相结合。同步荧光结果显示,在 BSA 中逐步加入黄芪甲苷和环黄芪醇溶液后,BSA 的色氨酸残基所处的微环境发生改变,疏水性降低,而酪氨酸残基所处的微环境没有发生改变。该研究可以为黄芪甲苷和环黄芪醇的用药提供理论依据。

### [参考文献]

[1] 曹艳玲,李文兰,张玉杰,等. 环黄芪醇对 D-半乳糖致衰老小鼠的抗衰老作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19):208.

[2] Zhou R N, Song Y L, Ruan J Q, et al. Pharmacokinetic evidence on the contribution of intestinal bacterial conversion to beneficial effects of astragaloside IV, a marker compound of astragali radix, in traditional oral use of the herb [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2012, 27(6):586.

[3] Zhu J, Lee S, Wong Y H, et al. In vitro intestinal absorption and first-pass intestinal and hepatic metabolism of cycloastragenol, a potent small molecule telomerase activator [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2010, 25(5):477.

[4] 许金钩,王尊本. 荧光分析法[M]. 北京:科学出版社,2007:5.

[5] Lakowica J R, Weber G. Quenching of fluorescence by oxygen. A probe for structural fluctuations in macromolecules [J]. Biochemistry, 1973, 12(21):4161.

# 不同产地枳实原药材及提取物的红外光谱鉴别

胡伊力格<sup>1</sup>, 王朝鲁<sup>2</sup>, 孙素琴<sup>3</sup>, 图雅<sup>4\*</sup>

(1. 内蒙古民族大学附属医院, 内蒙古 通辽 028000; 2. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102;  
3. 清华大学化学系分析中心, 北京 100084; 4. 中国中医科学院中医药发展研究中心, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:**对产自河北、广西、江西、江苏、云南 5 个产区的枳实样品进行宏观成分的整体鉴别。**方法:**采用傅里叶变换红外光谱、二阶导数谱和二维相关谱三级鉴别技术分析 5 个产地枳实的特征谱峰。**结果:**一维图谱中 5 个产地枳实原粉在 400~4 000 cm<sup>-1</sup>整体峰形较为相似,有 7 个共有峰,各产区枳实的整体化学成分基本相似,二阶导数谱上云南枳实的特征峰少且钝,江苏、江西的谱峰较多,峰形较尖锐。在二维相关谱上,5 个产地枳实形成的峰簇的数目和位置有明显差异。**结论:**三级红外光谱的谱学特征可以作为鉴别不同产地枳实的依据。

**[关键词]** 枳实; 红外光谱; 鉴定

**[中图分类号]** R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0127-05

**[doi]** 10.11653/syjf2013160127

## Different Origin of *Citrus aurantium* Raw Herbs and Their Extracts Infrared Spectroscopy

HUYI Lige<sup>1</sup>, WANG Chao-lu<sup>2</sup>, SUN Su-qin<sup>3</sup>, TU Ya<sup>4\*</sup>

(1. *Affiliated Hospital of Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China;*  
2. *Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China;*  
3. *Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China;* 4. *Development and  
Research Center of China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To compare the differences of the chemical constitutions of Frutus Aurantii Immaturus of different origin Places. **Method:** By one-dimensional FT-IR spectroscopy, second derivative spectra and two-dimensional related spectral analysis of IR spectra, the features of these spectrum peaks of Frutus Aurantii

**[收稿日期]** 20120815(003)

**[基金项目]** 自然科学基金地区科学基金项目(30860391);中国博士后基金项目(20090450444)

**[第一作者]** 胡伊力格, 硕士, 从事民族药物的基础与应用研究, E-mail: tlhry0475@163.com

**[通讯作者]** \* 图雅, 教授, 从事民族药、中药质量标准及药效物质基础研究, Tel: 010-64014411-2331, E-mail: tuyal26@126.com

[6] 尚永辉, 李华, 孙家娟. 荧光光谱法研究木犀草素与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 分析科学学报, 2010, 26(4): 419.

[7] Wei Y L, Li J Q, Dong C, et al. Investigation of the association behaviors between bilicerdin and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy [J]. Talanta, 2006, 70(2): 377.

[8] 王玲, 曲凌波, 李建军, 等. 槲皮素和芦丁与牛血清白蛋白相互作用研究[J]. 分析科学学报, 2006, 22

(6): 719.

[9] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions; forces contributing to stability [J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096.

[10] Wang N, Ye L, Yan F, et al. Spectroscopic studies on the interaction of azelnidipine with bovine serum albumin [J]. Int J Pharm, 2008, 351(1/2): 55.

[责任编辑 邹晓翠]