

胆汁酸盐对胆红素钙沉淀过程的影响

王 夔 卓济苍

(天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

许善锦 胡加平

(北京医科大学无机化学教研室, 北京 100083)

研究了六种人胆汁主要胆汁酸盐对胆红素钙沉淀形成过程的影响。用曲线拟合法处理数据取得热力学及动力学参数。结果表明, 六种胆汁酸盐都表现动力学和热力学抑制, 而且抑制作用有浓度依赖关系。在一定条件下出现诱导期。虽然不同胆汁酸盐的作用结果相似, 但在相同条件下, 二羟基胆汁酸和三羟基胆汁酸影响程度不同。

关键词: 胆红素钙 胆汁酸盐

胆汁酸盐是胆汁中抑制胆红素钙沉淀的重要因素。我们曾指出牛磺胆酸钠可以从动力学和热力学两方面表现抑制^[1]。鉴于结石患者胆汁中不仅胆汁酸盐总量偏低, 而且不同胆汁酸盐的含量比也有变化^[2,3], 因此人们认为不同胆汁酸盐对胆红素钙沉淀形成过程的影响不同。本文利用光散射法测定人胆汁中的六种主要胆汁酸盐的影响, 以便了解各种胆汁酸盐作用的差别, 以估计胆汁酸盐比例变化与成石的关系。

实验方法及数据处理方法

一. 仪器和试剂

荧光分光光度计(RF-540, 岛津)

胆红素(Sigma)。牛磺胆酸钠(TCA)、牛磺脱氧胆酸钠(TDCA)、牛磺鹅脱氧胆酸钠(TCDCA)、甘氨酸胆酸钠(GCA)、甘氨酸脱氧胆酸钠(GDCA)和甘氨酸鹅脱氧胆酸钠(GCDCA)纯度均>98%(Sigma)。氯化钙(A.R. 北京化工厂)溶液用配位滴定法标定。其他试剂均为A.R.或G.R.级。

二. 实验方法

胆红素工作溶液含胆红素 $4 \sim 5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 胆汁酸盐 5.0×10^{-3} 、 1.0×10^{-2} 、 1.5×10^{-2} 或 $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 为 7.9($0.02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ tris-HCl), 离子强度为 0.15(NaCl)。每一溶液均由精密称取胆红素, 最后精密定容, 以得到工作溶液, 立即使用。在 $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 先测光散射强度($\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}} = 542 \text{ nm}$)。然后精确加入一定量的 $0.5057 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 氯化钙溶液^[注]。在不同时间测光散射强度直到不再增加。在相同条件下用无胆红素的工作溶液

本文于1990年9月12日收到。

本工作为自然科学基金资助课题。

本工作为胡加平的博士学位论文的一部分。

[注] 为得到明显光散射变化, 牛磺结合胆汁酸情况下加入钙稍多(见表1)。

做空白测定,以确定光散射变化确由胆红素钙形成引起。

三. 数据处理方法

用计算机对所得光散射强度随时间变化的曲线进行拟合分析。一部分曲线呈简单的趋于平衡的指数形式,符合下列一级反应动力学方程:

$$C = C_0(1 - e^{-kt}) \quad (1)$$

其中, t 为反应时间 (min), C 为 t 时的光散射强度, C_0 为反应达到平衡时的最大光散射强度, k 为速度常数 (min^{-1})。另一些曲线因在开始阶段有诱导期而呈 S 形, 中间有一拐点^(1,4)。对它们采用分段拟合方法处理。拟合结果表明前一段 (诱导期) 符合式 (2),

$$C = C_T e^{k(t-T)} \quad (2)$$

后一段仍符合一级反应动力学方程:

$$C = C_0'(1 - e^{-k(t-T)}) + C_T \quad (3)$$

(2)及(3)式中的 T 为诱导期持续时间, C_T 为诱导期结束时的光散射强度, C_0' 为最后达到平衡时的最大光散射强度。

数据在拟合前先经归一化处理,即以该种胆汁酸盐在 $5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 时的最大光散射为 1 进行归一化。由于在一级反应动力学方程中数值的归一化不影响 k 值,因此用此法可直接得到一级反应速度常数。

另外,由最大光散射值可以评价不同浓度的各种胆汁酸对平衡的影响。利用前面归一化的数据可比较浓度的影响。

结 果

拟合结果列表 1 中。

表 1 胆汁酸盐存在下的胆红素钙沉淀形成反应

Table 1 Precipitation Formation of Calcium Bilirubinate in Presence of Bile Salts											
TCA bilirubin $4.91 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Ca ²⁺ $1.58 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$				TDCA bilirubin $4.99 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Ca ²⁺ $1.63 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$				TCDCA bilirubin $4.04 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Ca ²⁺ $1.63 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$			
<i>B</i>	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>k</i>	<i>B</i>	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>k</i>	<i>B</i>	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>k</i>
5.2	1.00	0	0.370	5.4	1.00	0	0.0571	5.2	1.00	2.0	0.114
10.4	0.85	3.0	0.263	10.8	0.75	0	0.0294	10.3	0.80	5.0	0.0869
15.6	0.80	6.0	0.182	16.1	0.63	0	0.0294	15.5	0.68	7.0	0.0769
20.7	0.77	9.0	0.127	21.5	0.54	0	0.0303	20.6	0.58	8.0	0.0714
GCA bilirubin $4.38 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Ca ²⁺ $6.24 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$				GDCA bilirubin $4.28 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Ca ²⁺ $6.24 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$				GCDCA bilirubin $4.28 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Ca ²⁺ $6.24 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$			
<i>B</i>	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>k</i>	<i>B</i>	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>k</i>	<i>B</i>	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>k</i>
5.0	1.00	2.0	0.263	5.0	1.00	0	0.0569	4.9	1.00	5.93	0.0645
10.0	0.75	4.0	0.143	10.0	0.76	0	0.0167	9.7	0.36	11.8	0.0425
15.0	0.72	20.0	0.074	15.0	0.49	0	0.0157	14.6	0.14	22.7	0.0291
20.0	—	120.0	—	20.0	0.35	0	0.0146	19.5	0.05	50.5	0.0215

为表现不同胆汁酸盐之间和同一胆汁酸盐不同浓度之间对速率常数、诱导期及平衡的影响,将测定结果作图得图1-3中的曲线。

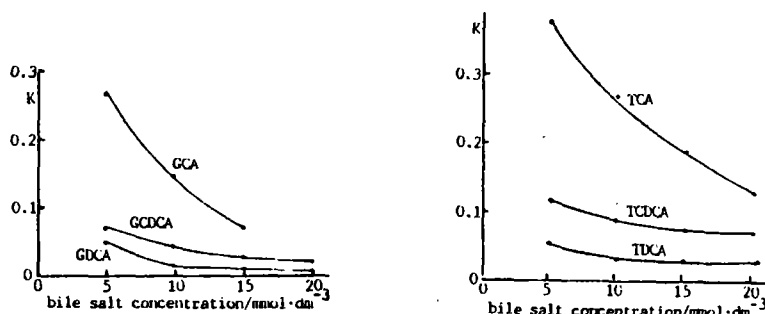


图1 胆汁酸盐对速率常数的影响

Fig.1 Effects of bile salts on the rate constant

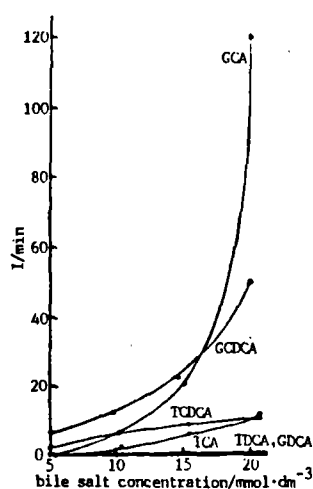


图2 胆汁酸盐对诱导期的影响

Fig.2 Effects of bile salts on the duration of induction period

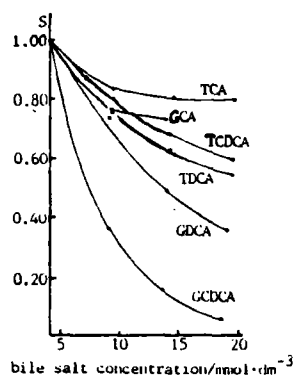


图3 胆汁酸盐对最大光散射影响

Fig.3 Effects of bile salts on the maximum intensity of light scattering

讨 论

无胆汁酸盐存在时,胆红素与钙离子形成胆红素钙沉淀的反应瞬时完成^[1]。本工作所涉及的六种胆汁酸盐均使反应速率常数降低、最大光散射降低,并在一定条件下出现诱导期。这些效应与胆汁酸盐浓度成正相关。说明胆汁酸盐对上述反应表现动力学和热力学抑制。

一.反应级数 在不同胆汁酸盐存在下,表现反应级数均为一。由于在这些实验中氯化钙均对胆红素过量,所以对胆红素呈一级反应。这与用其他方法研究 TCA 存在下的胆红素钙沉淀反应所得结果相同^[1,4]。即使在有诱导期出现下,诱导期之后的沉淀反应仍符合一级反应动

力学。

二.速率常数 由所得结果可见,不同胆汁酸盐都使速率常数降低,而且均随胆汁酸盐浓度的增加而减小。不同胆汁酸盐的影响程度不同。值得注意的是二羟基胆汁酸盐存在下的速率常数明显低于三羟基胆汁酸盐。这可能与前者疏水性较强有关。还可从结果看出各鹅脱氧胆酸的抑制作用都比相应的脱氧胆酸稍弱。另外,在浓度从 $5\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 增至 $20\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 的范围内,二羟基胆汁酸盐所引起的速率常数变化幅度小于三羟基胆汁酸盐,而且胆汁酸盐浓度越高,变化幅度越小。考虑到三羟基胆汁酸盐的临界胶束浓度在 $10\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 左右,而二羟基胆汁酸盐在 $5\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 左右,可以设想上述差别是由于在 $> 5\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 浓度时,二羟基胆汁酸盐已成胶束态,浓度的增加不再明显增加抑制作用,而三羟基胆汁酸盐正处于胶束前状态,浓度的增加可引起较大的抑制作用增加。这也提示,胆汁酸盐对速率的影响在胶束态比在胶束前状态更强。

三.诱导期 从图 2 可见 TDCA 及 GDCA 在浓度高达 $20\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 时仍无诱导期出现,其余四种都能使诱导期出现,并随浓度增加而延长。其中 GCA 及 GCDCA 浓度变化时诱导期变化最为明显。诱导期的出现说明胆红素钙沉淀的形成不是通过胆红素阴离子与钙离子直接结合而实现的。因为在胆汁酸盐背景中,胆红素和钙离子都处于胶束结合态,所以它们之间的反应受到影响。

四.平衡状态 从图 3 可见胆汁酸盐从平衡上抑制沉淀反应,并随浓度增加其最大光散射降低。还可看出,在实验浓度范围内,二羟基胆汁酸盐的抑制作用大于三羟基胆汁酸盐,而且甘氨酸结合胆汁酸盐的抑制作用随浓度的变化大于牛磺结合胆汁酸盐,二羟基胆汁酸盐的抑制作用随浓度的变化大于三羟基胆汁酸盐。在这几方面与对速率常数的影响表现相似。

总的来说,胆汁酸盐均可从平衡和反应速率两方面抑制胆红素钙的形成,而且随浓度增加,抑制作用增强。各胆汁酸盐的抑制能力和浓度依赖关系不同。一般来说,二羟基胆汁酸盐比三羟基胆汁酸盐抑制能力强,在 $5 \sim 20\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 浓度范围内随浓度变化大。前者与疏水性差别可能有关;后者可认为由于临界胶束浓度不同所致。

胆红素钙的沉淀与聚集是色素结石形成的基本反应。上述结果表明,胆汁酸盐总浓度下降以及各胆汁酸盐的相对含量变化,都可成为结石形成的原因。

致谢: 本工作承刘维勤教授指导,并承汪维中副研究员和肖汉助理工程师热情帮助,谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] 许善锦等, 无机化学, 2(3), 1(1986).
[2] Soloway R.D., *Gastroenterology*, 72, 167(1977).
[3] 王志伟等, 江苏医药, 13(5), 244(1987).
[4] 刘湘陶等, 北京医科大学学报, 19, 411(1987).

EFFECTS OF BILE SALTS ON THE PRECIPITATION PROCESS OF CALCIUM BILIRUBINATE

Wang Kui Zhuo Jicang

(*Research Laboratories of Natural and Biomimetic Drugs, Beijing 100083*)

Xu Shanjin Hu Jiaping

(*Department of Inorganic Chemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083*)

The effects of six bile salts on the precipitation formation process of calcium bilirubinate were studied by means of measuring the light scattering of the reaction mixtures in the presence of various bile salts of different concentrations. The data were treated by curve-fitting method and the kinetic and thermodynamic parameters were obtained and compared. The results show that all the bile salts inhibit the reaction thermodynamically and kinetically and the inhibition effect was found to be concentration-dependent. An induction period was observed under certain conditions. Although similar results were obtained from various bile salts, the affects of dihydroxycholates and trihydroxycholates are different under same conditions. This diversity was discussed on the ground of the hydrophobicity and micelle formation.

Keywords: calcium bilirubinate bile salt