中国科学: 化学 2019 年 第 49 卷 第 10 期: 1272 ~ 1281
SCIENTIA SINICA Chimica chemcn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

论 文

基于光谱分析的阿片类毒品吗啡、海洛因与乙醇协同作用机制研究

崔胜峰[1*], 马素娟[1], 万敬伟[1], 周成合[2*]

1. 铁道警察学院刑事科学技术系, 交通物证技术研究中心, 郑州 450053
2. 西南大学化学化工学院, 重庆市高校应用化学重点实验室, 重庆 400715
* 通讯作者, E-mail: cuishengfeng@rpc.edu.cn; zhouch@swu.edu.cn

收稿日期: 2019-07-21; 接受日期: 2019-09-27; 网络版发表日期: 2019-10-17
国家自然科学基金青年科学基金(编号: 21805208)、河南省科技攻关计划项目(编号: 172102310603, 172102210112)、河南省高等学校重点科研项目计划(编号: 16A350009, 20B620002)和中央高校基本科研业务经费项目(编号: 2018TJJBKY016, 2019TJJBKY032)资助

摘要 阿片类毒品与乙醇双重滥用导致的协同作用一直是药物化学、法庭科学、公共安全等领域研究的热点和重点之一. 本文基于现代光谱分析技术和大鼠体内实验, 详细、系统地探索了阿片类毒品吗啡、海洛因与乙醇双重滥用而导致的协同作用机制. 研究结果显示, 在吗啡、海洛因体内代谢初期, 血液中存在的不同浓度的乙醇以竞争的方式不同程度地降低吗啡、海洛因和人血清白蛋白的结合, 致使血液中吗啡、海洛因游离分子的浓度短时间内迅速增大, 代谢进程明显放缓, 且吗啡和海洛因分子可以在血液中较长时间地维持高浓度水平, 从而增强吗啡和海洛因在体内的药效和吸食者的主观感受, 产生协同作用. 与此同时, 在乙醇和吗啡同时给药情况下, 生物活性更强的吗啡代谢中间产物——吗啡-6-葡萄糖苷酸在血液中的浓度相应地呈现出缓慢增加并较长时间在血液中存在的特点, 这一特点进一步加强了吗啡与乙醇的协同作用.

关键词 海洛因, 吗啡, 光谱分析, 乙醇, 协同作用

1 引言

阿片类毒品因其强烈的成瘾性和巨大的社会危害性成为一类世界范围内滥用最广、危害最大的毒品之一, 主要分为天然类(吗啡、可待因等)、半合成类(海洛因、羟考酮等)和合成类(美沙酮、芬太尼等)[1]. 数据显示, 2017年全球有近2000万人因吸食阿片类毒品而产生生理性障碍, 并引发诸如艾滋病、肝炎等多种传染性疾病, 给人类健康和社会稳定造成了极大的伤害, 相关研究工作持续受到各界的重点关注[2,3]. 自1805年第一个阿片类毒品吗啡被分离提纯以来, 阿片类化合物的相关研究工作成为药物化学、医学、生命科学、法庭科学、公共安全等众多领域研究的重点和热点[4]. 大量工作致力于阿片类药物的结构修饰、作用机制、成瘾机制、戒断机制以及成瘾治疗等相关方面的研究, 且已取得许多重要的研究成果, 研发出多种阿片类镇痛药物, 相关作用机理也得以阐明[5]. 研究结果显示, 阿片类毒品的作用靶点、成瘾机制以及戒断机制与体内参与调解G蛋白循环的RGS蛋白有着密切的联系[6,7]. 此外, 阿片类毒品的滥用, 尤其是吗啡和海

引用格式: Cui S, Ma S, Wan J, Zhou C. Molecular spectroscopic studies examining the synergistic mechanism of opioid morphine, heroin and ethanol. *Sci Sin Chim*, 2019, 49: 1272–1281, doi: 10.1360/SSC-2019-0095

© 2019 《中国科学》杂志社

洛因的滥用, 给公共安全和社会稳定带来了巨大的威胁. 因摄入过量阿片类毒品而导致的死亡、凶杀、暴力、毒驾等行为成为分析化学、药物化学、公共安全领域关注的重点[8].

酒精依赖是世界范围内流行最广的慢性疾病之一, 发病机制复杂, 主要由环境、遗传等多种因素的复杂相互作用逐渐积累而引起的[9]. 酒精依赖患者也易并发多种危及健康的疾病(2-型糖尿病、痛风、抑郁), 并导致诸多如醉驾、家暴、自杀和非法药物滥用等严重的社会问题[10]. 酒精依赖的相关研究工作众多, 发展迅速, 尤其是在发病机制、作用靶点、戒断症状药物治疗等方面取得了众多的杰出成果, 是一个充满活力的热点领域[11,12].

在众多的阿片类毒品成瘾患者中, 由于多种因素的诱导使得患者极易引发高风险的酒精滥用. 临床研究结果显示, 阿片类毒品滥用和酒精依赖之间存在着高度的共病, 并且阿片类毒品和酒精的同时摄入又增加了二者双重滥用的概率[13]. 研究显示, 酒精的摄入能够增强体内阿片类毒品对作用靶点的抑制作用, 从而产生强的协同作用, 导致主观感受增强、心率加快, 甚至引发死亡, 具有潜在的生命威胁[14]. 此外, 临床上还发现酒精依赖患者存在大几率的同时引发阿片类毒品滥用的风险. 阿片类毒品与乙醇体内协同作用机制的相关研究已经成为化学、药学、公共安全等领域亟待解决的重要问题之一. 基于此, 在本课题组[15~19]前期工作的基础上, 本文选用阿片类毒品吗啡和海洛因, 利用紫外-可见光谱、荧光光谱、圆二色谱等光谱技术, 体外模拟生理环境研究吗啡、海洛因与人血清白蛋白(HSA)的相互作用机制以及血液中不同浓度的乙醇对吗啡、海洛因和HSA相互作用的影响, 探索血液中乙醇对吗啡、海洛因分子代谢初期产生的影响. 此外, 还利用大鼠体内实验进一步研究了阿片类毒品与乙醇的协同作用机制.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

吗啡(标准品, 1 mg/mL甲醇溶液, Sigma-Aldrich公司, 美国); 海洛因(标准品, 1 mg/mL甲醇溶液, Sigma-Aldrich公司); 人血清白蛋白(HSA, >99.5%, Sigma-Aldrich公司); 无水乙醇(分析纯, 恒兴化学试剂制造公司, 天津); Tris-HCl缓冲溶液(pH=7.4, Sigma-Aldrich公司); 二甲基亚砜(分析纯, 恒兴化学试剂制造公司); 实验用水均为超纯水; 大鼠160只, 雌性, 体重142~180 g.

Milli-Q Advantage型超纯水系统(Millipore 公司, 德国); W501型数显恒温水浴锅(长城科工贸有限公司, 郑州); F-4600荧光光谱仪(配备1.0 cm吸收池, 150 W氙灯, Hitachi公司, 日本); GC-MS-2010 plus型气相色谱仪(Shimadzu公司, 日本); 紫外-可见吸收光谱TU-2450(配备1.0 cm吸收池, 普析通用仪器公司, 北京); 圆二色分光光度计CPL-300 (Jasco公司, 日本); 冷冻离心机Centrifuge 5430R (eppendorf公司, 德国).

2.2 荧光光谱的测定

准确称取0.0330 g的HSA固体溶于一定体积的Tris-HCl缓冲溶液中, 配制成1.0×10^{-5} mol/L的HSA溶液, 静置过夜, 2℃避光保存; 配制成浓度均为1.5×10^{-3} mol/L的吗啡和海洛因的二甲基亚砜(DMSO)溶液. 体系荧光光谱的测定均使用1 cm吸收池, 在150 W氙灯、激发和发射狭缝宽度均为2.5 nm、激发波长为295 nm、测定范围为220~375 nm条件下由F-4600荧光仪测定. 2 mL 1.0×10^{-5} mol/L的HSA溶液分别被吗啡和海洛因溶液连续滴定, 每次滴定静置2 min达到平衡, 记录25、30、37℃条件下各自体系的荧光曲线.

向2 mL的HSA溶液中加入一定量的乙醇使得体系中乙醇含量分别达到0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.6 g/mL. 达到平衡后, 再以上述相同的荧光条件用1.5×10^{-3} mol/L的吗啡和海洛因溶液分别连续滴定, 记录7种乙醇浓度下的吗啡-HSA和海洛因-HSA体系的荧光变化曲线.

2.3 紫外-可见吸收光谱的测定

分别配制浓度均为1.0×10^{-7} mol/L的HSA溶液、吗啡溶液、海洛因溶液、HSA-吗啡(摩尔比=1:1)以及HSA-海洛因(摩尔比=1:1)溶液. HSA-吗啡(摩尔比=1:1)和HSA-海洛因(摩尔比=1:1)溶液配制完成后室温下静置5 min. 体系的紫外-可见光谱均用1 cm的吸收池, 测定波长范围190~320 nm.

2.4 圆二色谱的测定

移取0.5 mL 1.0×10^{-7} mol/L的HSA于1 mm的石英比色皿中, 用微量进样器依次加入适量的浓度为

1.5×10^{-3} mol/L的吗啡或海洛因溶液, 每次加入溶液后静置3 min, 在圆二色谱测定190~250 nm范围内的圆二色谱曲线.

2.5 体内乙醇对阿片类毒品代谢影响的测定

选取重量为142~180 g的雌性大鼠, 随机分为4组, 每组40只, 大鼠禁食禁水12 h. 各组大鼠均按照20 mg/kg吗啡腹腔注射给药, 乙醇则分别按照0、400、800、1200 mg/kg的浓度以腹腔注射的方式同时给药. 分别在给药5、10、18、24、30、36、60、120 min时采用颈椎脱臼处死, 取心血1 mL, 在0℃条件下以2000 r/min速度用冷冻离心机离心3 min, 取上层清液, 用0.5 mL乙酸乙酯连续萃取三次, 合并有机相, 经N_2流吹干, 甲醇定容, 备用. 再用气相色谱与质谱联用仪分析.

3 结果与讨论

3.1 吗啡、海洛因与HSA的相互作用机制

人血清白蛋白是血液中存在的一种重要的大分子蛋白, 可以储存和运输氨基酸、脂肪酸、药物等内源性和外源性小分子, 在小分子的体内分布与代谢过程中扮演着重要角色[20]. 当药物分子进入血液后, 随即与HSA发生相互作用而可逆地结合, 生成药物分子-HSA络合物, 随之游离型的药物分子和结合型的药物分子在血液中达到动态平衡, 而当游离药物分子因体内代谢使得血液中游离药物分子浓度降低时, 与HSA结合的药物分子就会释放出来, 建立新的平衡, 从而影响药物分子在体内的药效. 基于此, 研究药物分子与HSA的相互作用对药物代谢有着重要的意义.

荧光光谱、紫外-可见吸收光谱和圆二色谱在研究HSA大分子的构象变化和HSA-小分子络合物相互作用方面有着重要、广泛的应用[21,22].

荧光光谱法是一种公认的研究HSA与药物分子相互作用的有效方法之一. 与传统的透析法和电位滴定法相比, 荧光光谱法具有样本量少、灵敏度高、快速、易操作等优点[23]. 通过荧光光谱和相关数据分析计算可以得到药物分子和HSA相互作用的多种物理参数, 如结合常数、结合位点等, 从不同角度反映药物小分子和蛋白分子的成键和结构情况, 得到药物小分子-HSA络合物的相互作用机制和相互作用模型[24]. Trp-214残基是HSA大分子结构中主要的荧光基团, 对大分子的微环境变化极其敏感, 因此常被用作内源荧光探针研究HSA与药物小分子之间的相互作用[25].

在激发波长λ_{ex}=295 nm和室温(T=298 K)条件下分别用浓度均为5.0×10^{-5} mol/L的吗啡和海洛因溶液连续滴定1.0×10^{-5} mol/L的HSA溶液, 用荧光仪分别记录吗啡-HSA体系和海洛因-HSA体系的荧光变化曲线. 如图1和2所示, 图中红色虚线是只存在吗啡或海洛因时的荧光曲线(浓度均为7.5×10^{-5} mol/L, λ_{ex}=295 nm, T=298 K), 相比于同等激发条件下的HSA溶液的荧光强度, 二者自身荧光强度对体系荧光强度的影响可以

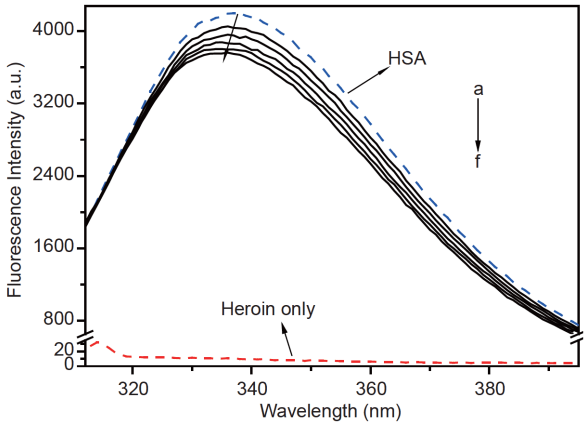


图 1 一定浓度的海洛因连续滴定HSA溶液的荧光变化曲线(网络版彩图)

Figure 1 Emission spectra of HSA in the presence of various concentrations of heroin (color online).

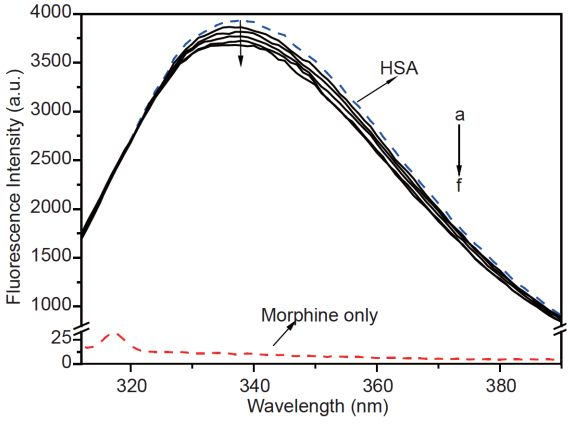


图 2 一定浓度的吗啡连续滴定HSA溶液的荧光变化曲线(网络版彩图)

Figure 2 Emission spectra of HSA in the presence of various concentrations of morphine (color online).

忽略不计. 随着滴定过程的进行, 体系中吗啡或海洛因的浓度逐渐增大, HSA溶液发生了荧光淬灭现象. 在吗啡-HSA体系中, HSA溶液在波长338 nm处出现最大发射峰, 并且随着吗啡溶液的滴定, 体系中最大吸收峰的波长没有发生变化, 无明显的红移和蓝移现象. 由此可知, 残基色氨酸Trp-214的极性没有发生变化, 可以初步得到吗啡小分子与位于HSA疏水区域的Trp-214残基发生了相互作用, 从而导致了淬灭现象的发生. 在海洛因-HSA体系中, 随着滴定的进行海洛因分子的浓度逐渐增大, HSA最大发射峰波长从338 nm移至334 nm, 发生了明显蓝移现象, 可以初步得出海洛因小分子与Trp-214残基发生相互作用, 使其周围微环境疏水性增加, 极性减小, 导致淬灭现象的发生.

HSA的荧光淬灭可由Stern-Volmer方程进行分析, 利用线性回归做出F_0/F对$[Q]$的曲线图可以计算出方程中K_{SV}值:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q]$$

其中F_0是仅含有HSA的溶液的最大发射峰的荧光强度; F是滴定过程中加入吗啡或海洛因后的体系最大发射峰的荧光强度; K_{SV} (L/mol)是Stern-Volmer方程淬灭常数, Q (mol/L)是体系中海洛因或吗啡的浓度.

HSA的荧光淬灭的机制有两种, 即静态淬灭机制和动态淬灭机制. 静态淬灭机制是荧光分子与淬灭剂之间通过弱的非共价键作用力生成基态络合物而导致的荧光淬灭, 其特征是随着体系温度的升高, Stern-Volmer方程淬灭常数K_{SV}的值降低. 动态淬灭机制则是激发态荧光分子与淬灭剂碰撞导致的荧光淬灭, 并且随着体系温度的升高, Stern-Volmer方程淬灭常数K_{SV}升高[26]. 因此, 可以通过改变体系滴定温度来判定HSA的荧光淬灭机制. 为进一步研究吗啡和海洛因淬灭HSA荧光的作用机制, 本文在体系温度分别为298、303和310 K条件下探索了吗啡、海洛因滴定HSA溶液的荧光淬灭变化曲线.

表1是实验设定的三种温度下吗啡-HSA和海洛因-HSA体系线性拟合方程中K_{SV}值的汇总, 三种设定温度下的吗啡-HSA和海洛因-HSA (图3)体系的实验数据经拟合后均显示出良好的线性关系. 研究结果发现, 吗啡-HSA和海洛因-HSA二者体系的淬灭常数K_{SV}均随着体系温度的升高而降低. 由此可知, 吗啡-HSA和海洛因-HSA体系的荧光淬灭可能是基于静态淬灭机理, 初步推断是由于吗啡或海洛因小分子分别与HSA分子结构中的Trp-214残基通过弱的非共价键相互作用生成了吗啡-HSA和海洛因-HSA络合物而导致HSA溶液的荧光淬灭.

表 1　吗啡-HSA和海洛因-HSA体系Stern-Volmer方程常数值[a)]

Table 1　Stern-Volmer quenching constants for morphine-HSA and heroin-HSA systems[a)]

T (K)	K_{SV} (海洛因, L/mol)	K_{SV} (吗啡, L/mol)
298	8.53×10^5	7.32×10^5
303	7.43×10^5	4.80×10^5
310	5.78×10^5	4.29×10^5

a) 海洛因相关系数R依次为0.997, 0.999, 0.993, 吗啡的相关系数依次为0.995, 0.994, 0.997

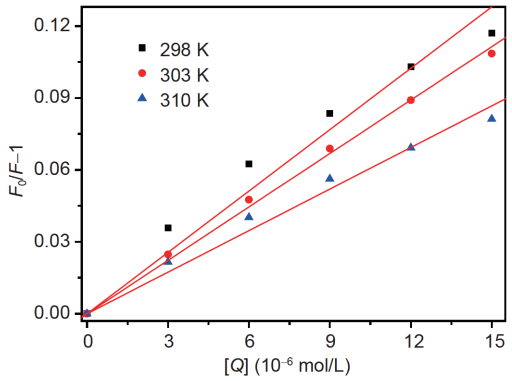


图 3　不同温度下海洛因滴定HSA的Stern-Volmer线性方程(网络版彩图)

Figure 3　Stern-Volmer plots of heroin-HSA system at different temperatures (color online).

为进一步证明体系是由于生成吗啡-HSA和海洛因-HSA络合物而导致的荧光淬灭, 本文利用紫外-可见光谱研究了二者体系的紫外-可见吸收光谱的差谱. 实验结果显示, 等浓度条件下, HSA的吸收曲线和吗啡-HSA络合物、海洛因-HSA络合物分别与吗啡、海洛因吸收曲线的差谱不能重合, 图4是海洛因体系的紫外-可见吸收光谱的差谱, 并且与等浓度HSA吸收曲线相比, 差谱在193.5 nm处的HSA特征吸收峰强度急剧增强. 上述差谱的特征进一步证实了在吗啡-HSA和海洛因-HSA体系中分别有吗啡-HSA和海洛因-HSA络合物生成[27].

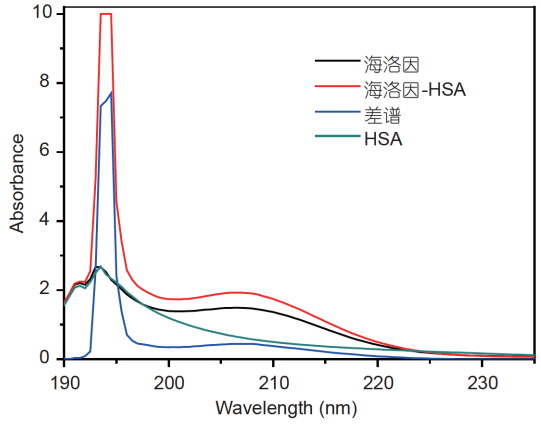


图 4 海洛因、HSA、海洛因-HSA络合物以及等浓度的海洛因-HSA络合物与海洛因的差谱的紫外吸收曲线(网络版彩图)

Figure 4 UV-vis absorption spectra of HSA with different concentrations of heroin (color online).

基于上述讨论说明, 吗啡、海洛因体系荧光淬灭是静态淬灭, 由静态淬灭机制引起的荧光淬灭可通过修正后的Stern-Volmer方程进行分析:

$$\frac{F_0}{\Delta F}=\frac{1}{f_a K_a}\frac{1}{[Q]}+\frac{1}{f_a}$$

其中, ΔF是未滴加吗啡或海洛因时HSA体系的荧光强度与每次滴加后体系的荧光强度的差值; K_a和f_a分别是有效淬灭常数和荧光强度系数. 利用线性回归方程做出$F_0/\Delta F$对$[Q]^{-1}$的曲线图可以计算得到K_a的值.

如表2所示, 实验设定的三种温度下海洛因-HSA体系(图5)和吗啡-HSA体系的荧光淬灭数据拟合的结果仍呈现出良好的线性关系. 并且与Stern-Volmer方程中的淬灭常数K_{SV}随温度变化的关系相同, 修正方程的淬灭常数K_a也与体系的温度呈现反比关系, 即随着体系温度的升高K_a的值逐渐降低. 上述实验结果更进一步证明了海洛因-HSA体系和吗啡-HSA体系的荧光淬灭是由于体系中各自生成了相应的络合物而导致的.

在静态淬灭机制的基础上, 利用Scatchard方程计算出体系的结合平衡常数:

$$\frac{r}{D_f}=nK_b-rK_b$$

其中r是每摩尔HSA结合小分子的摩尔数; D_f是体系中淬灭剂自由小分子的浓度; K_b是结合平衡常数; n是结合位点数.

如表3所示, 吗啡-HSA络合物和海洛因-HSA络合物(图6)的结合平衡常数K_b也随着体系温度的升高而降低. 二者体系的K_b值的数量级均在10^5, 预示着吗啡、海洛因在体内转运、储存等过程中和HSA结合力适中[28]. 此外, 实验数据显示, 海洛因与HSA的结合平衡常数(6.36×10^5 L/mol)大于吗啡的结合平衡常数(5.73×10^5 L/mol), 说明海洛因在血液中与HSA的结合能力强于吗啡.

表 2 吗啡-HSA和海洛因-HSA体系修正Stern-Volmer常数值[a)]

Table 2 Modified Stern-Volmer constants of morphine-HSA and heroin-HSA systems[a)]

T (K)	K_a (海洛因, L/mol)	K_a (吗啡, L/mol)
298	6.54×10^5	5.59×10^5
303	3.69×10^5	4.98×10^5
310	2.15×10^5	4.25×10^5

a) 海洛因相关系数R依次为0.999, 0.999, 0.999, 吗啡的相关系数依次为0.999, 0.999, 0.999

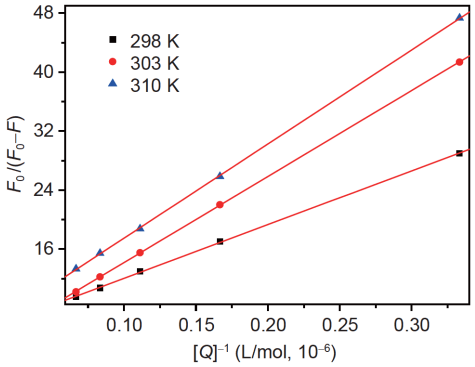


图 5 不同温度海洛因滴定HSA的修正Stern-Volmer拟合曲线(网络版彩图)

Figure 5 Modified Stern-Volmer plots of heroin-HSA system at different temperatures (color online).

圆二色光谱是一种可以灵敏地检测蛋白质分子二级结构的方法, 广泛用于HSA-小分子络合物的稀溶液构象测定[29]. 在纯HSA的圆二色谱图谱中血清蛋白的α-螺旋结构在靠近192 nm有一正的谱带, 在222和208 nm处有两个负的特征肩峰谱带[30]. 如图7所示, 在192 nm处出现一正的谱带, 在波长208和222 nm出现两个负的肩峰谱带, 并且随着吗啡浓度的增加, 体系在192、208和222 nm处峰谱带的波长基本保持不变, 说明在实验浓度范围内吗啡小分子对HSA的二级结构基本没有产生影响, 在血液中对HSA的结构影响很小, 表

表 3　吗啡-HSA和海洛因-HSA体系Scatchard方程的常数值

Table 3　Binding constants for morphine-HSA and heroin-HSA systems

T (K)	吗啡		海洛因	
	K_b (L/mol)	R	K_b (L/mol)	R
298	5.73×10^5	0.999	6.36×10^5	0.998
303	4.98×10^5	0.998	3.81×10^5	0.999
310	4.23×10^5	0.999	2.08×10^5	0.999

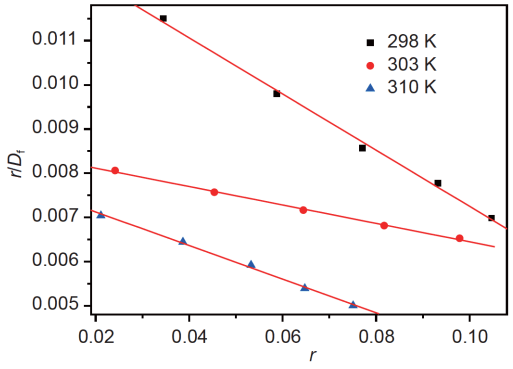


图 6　不同温度下海洛因滴定HSA的Scatchard方程拟合曲线(网络版彩图)

Figure 6　Scatchard plots of heroin-HSA system at different temperatures (color online).

明一定浓度范围内吗啡可以被HSA安全携带达到作用靶点. 与此同时, 在192 nm处摩尔比(吗啡:HSA)为0:1和2:1时峰强度基本保持不变, 而在4:1和8:1时峰强度明显增强. 并且两个负的肩峰强度随着吗啡浓度的增加而降低. 这一现象表明, 吗啡与HSA存在着复杂的相互作用, 随着体系中吗啡浓度的增加使得HSA的α-螺旋结构含量降低[31]. 此外, 海洛因与HSA体系的圆二色谱实验结果与吗啡的结果相似(图8). 圆二色谱的实验结果与荧光光谱、紫外-可见光谱的结果一致.

3.2　不同浓度乙醇对吗啡、海洛因与HSA相互作用的影响

阿片类毒品与酒精的双重滥用会对身心健康带来巨大的危害, 临床研究显示乙醇的摄入能够增强阿片类毒品的生物活性. 在代谢始端, 吗啡、海洛因小分子在和乙醇同时摄入体内时, 血液中乙醇的存在会对吗啡-HSA和海洛因-HSA体系产生一定的影响, 改变毒品在体内代谢始端的进程, 从而对吗啡和海洛因毒

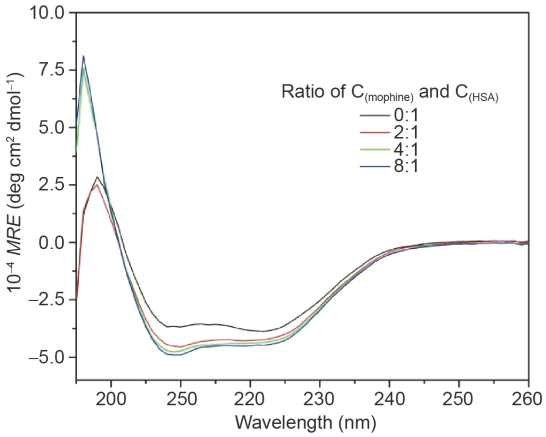


图 7　不同浓度吗啡滴定HSA的圆二色谱图(网络版彩图)

Figure 7　Circular dichroism spectra of HSA with increasing concentrations of morphine (color online).

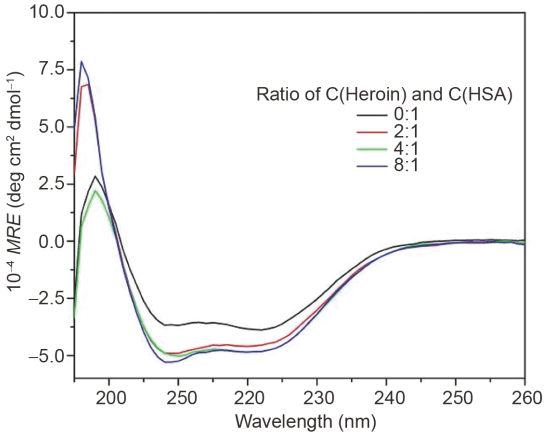


图 8　不同浓度海洛因滴定HSA的圆二色谱图(网络版彩图)

Figure 8　Circular dichroism spectra of HSA with increasing concentrations of heroin (color online).

品和/或乙醇的体内活性产生影响. 基于此, 为探索乙醇对阿片类毒品与HSA相互作用的影响, 在上述讨论的基础上, 本文模拟了生理环境研究不同浓度的乙醇对HSA与吗啡和海洛因小分子的相互作用的影响, 探索在代谢初期阿片类毒品和酒精的协同作用机制.

实验结果显示, 在向浓度为1.0×10^{-5} mol/L的HSA溶液滴定过程中, 当体系中乙醇浓度达到实验所需最大值(体系中乙醇为1.6 mg/L时HSA在338 nm处的荧光强度仍能达到3936 a.u.)时, 体系仍具有足够强的荧光强度, 可以充分保障吗啡或海洛因的后续滴定. 如表4所示, 与体系中不存在乙醇时体系的平衡结合常数(K_0)相比, 不同浓度的乙醇(0.2~1.6 mg/mL)对吗啡-

表 4 不同浓度乙醇对吗啡-HSA和海洛因-HSA体系平衡常数的影响[a)]

Table 4 Effect of ethanol on the binding constants of morphine-HSA and heroin-HSA system[a)]

乙醇 (mg/mL)	吗啡			海洛因		
	K_b (L/mol)	K_b/K_0 (%)	R	K_b (L/mol)	K_b/K_0 (%)	R
0.2	5.36×10^5	93.5	0.999	3.82×10^5	60.5	0.999
0.4	1.42×10^5	24.8	0.996	5.83×10^5	92.4	0.997
0.6	2.22×10^5	38.7	0.998	2.49×10^5	39.5	0.998
0.8	3.40×10^5	59.3	0.996	3.71×10^5	58.8	0.999
1.0	4.20×10^5	73.3	0.999	3.82×10^5	54.0	0.999
1.2	4.46×10^5	77.8	0.998	3.51×10^5	55.6	0.996
1.4	4.78×10^5	83.4	0.992	4.45×10^5	70.5	0.998
1.6	4.32×10^5	75.4	0.995	4.89×10^5	77.5	0.999

a) K_0是体系不存在乙醇时的平衡结合常数, K_b是不同浓度的乙醇(0.2~1.6 mg/mL)存在时吗啡-HSA体系和海洛因-HSA体系的平衡结合常数

HSA体系和海洛因-HSA体系的平衡结合常数(K_b)显示出不同程度的影响. 整体上, 体系中不同浓度的乙醇分子通过与吗啡或海洛因分子竞争的方式均不同程度地降低了吗啡、海洛因与HSA的结合平衡常数, 并且结合平衡常数降低的趋势并非随着乙醇浓度的增大而减小.

实验结果显示, 在乙醇-吗啡-HSA体系中, 相比于不存在乙醇的吗啡-HSA体系的结合平衡常数, 不同浓度乙醇的存在对吗啡-HSA体系的结合平衡常数表现出较大的影响, 乙醇的存在使得K_b值均呈现出不同程度的降低, K_b/K_0在24.8%~93.5%. 其中乙醇为0.4 mg/mL时, 吗啡与HSA的结合平衡常数将至最低, K_b/K_0值降低至24.8%. 在0.6~1.6 mg/mL区间内, 随着体系中乙醇浓度增大, 吗啡与HSA的结合平衡常数呈现出逐渐升高的趋势; 而对于海洛因-HSA体系, 不同浓度乙醇的存在对体系的结合平衡常数也表现出相似的影响, K_b值也均显示出不同程度的下降, K_b/K_0在39.5%~92.4%. 其中乙醇浓度为0.6 mg/mL时, 海洛因与HSA的结合平衡常数降至最低, K_b/K_0值降低至39.5%. 在0.8~1.6 mg/mL区间内, 随着体系中乙醇浓度增大, 海洛因与HSA的结合平衡常数也呈现出逐渐升高的趋势. 此外, 在低浓度乙醇存在时(0.2~0.6 mg/mL), 海洛因和吗啡体系K_b值的整体降低趋势较大, 表明血液中低浓度的乙醇分子对吗啡-HSA体系和海洛因-HSA体系的结合常数影响较大. 基于上述讨论, 在实验设定的乙醇浓度的范围内, 可以证明由于在吗啡、海洛因被吸收进入血液后, 血液中存在的乙醇分子可以通过与吗啡、海洛因小分子竞争的方式导致吗啡-HSA体系和海洛因-HSA体系的结合常数降低, 致使血液中吗啡或海洛因游离分子的相对浓度增大, 影响吗啡和海洛因分子的代谢始端的进程和半衰期, 从而增强小分子在体内的药效, 产生协同增强作用.

3.3 体内乙醇对阿片类毒品代谢的影响

在上述光谱分析的基础上, 为进一步研究乙醇对吗啡、海洛因与HSA相互作用的影响, 探索乙醇和阿片类毒品体内的协同作用机制, 本文选用吗啡纯品, 利用大鼠体内实验以腹腔注射的给药方式研究大鼠心脏血液不同浓度的乙醇(0、400、800、1200 mg/kg)对血清中吗啡游离分子浓度的影响.

大鼠体内实验结果显示(图9), 与吗啡单独给药时心血血清中吗啡的浓度相比, 血液中不同浓度的乙醇对血清中的吗啡浓度有着较大的影响. 总体上, 在实验设定的检测时间范围内, 与吗啡单独腹腔注射给药相比, 吗啡和乙醇同时给药条件下吗啡在心血血清中的浓度明显增高, 体内吗啡浓度的峰值均出现不同程度地升高, 并且能够在血液中长时间地维持较高浓度水平, 半衰期变长, 吗啡体内的生物活性明显增强. 此外, 吗啡单独给药时心血血清中吗啡游离分子浓度相对较低且代谢迅速, 给药10 min后血液中吗啡的浓度就显示出急剧降低的趋势, 18 min后吗啡在心血中的浓度基本达到最低值. 然而, 在乙醇为400、800、1200 mg/kg与吗啡同时给药条件下大鼠心血血清中的吗啡游离分子的浓度均有较大程度的升高, 且长时间

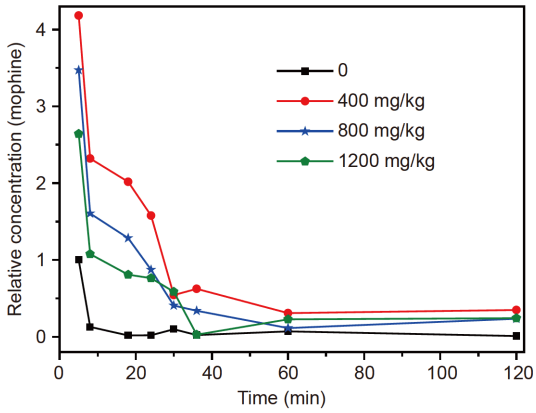


图 9　不同浓度乙醇条件下乙醇和吗啡同时腹腔给药时大鼠心血血清中吗啡随时间变化曲线. 每个点为5次平行实验的平均值, 相对浓度值均是相对于吗啡单独给药5 min时吗啡心血血清中浓度的相对值(网络版彩图)

Figure 9　Effect of various concentrations of ethanol on morphine in heart blood of mouse under the conditions of intraperitoneal administration of ethanol and morphine. Each point is the average of 5 parallel experiments. The relative concentration values are relative to the concentration of morphine in the blood serum of morphine only at 5 min (color online).

维持高水平浓度, 在给药36 min后血清中的吗啡浓度才出现较大程度的降低. 尤其是在400 mg/kg乙醇和吗啡同时给药条件下, 5 min时心血血清的吗啡浓度是吗啡单独给药的4.2倍, 其活性最强, 并且能够较长时间地维持吗啡在血液中较高的浓度水平, 60 min时吗啡在血清的浓度仍最高, 其代谢进程明显变缓, 半衰期延长了3.1倍. 800、1200 mg/kg乙醇和吗啡同时腹腔注射的条件下大鼠心血中吗啡的浓度也呈现出上述现象, 但其程度有所降低, 但是给药5 min时血清中吗啡的浓度仍分别是吗啡单独给药时的3.4和2.6倍, 给药10~36 min内血清中的吗啡浓度均远远高于吗啡单独给药时的浓度. 此外, 实验结果显示, 血液中游离吗啡浓度并非随着体内乙醇的浓度升高而增加, 呈现单调趋势, 而是在一定区间内有峰值, 并且在低浓度乙醇存在条件下血液中游离吗啡的浓度相对较高, 这与荧光分析实验得到的低浓度的乙醇分子存在对吗啡-HSA体系和海洛因-HSA体系的结合常数影响较大相一致. 由此可知, 大鼠体内不同浓度的乙醇降低了吗啡和血液中HSA的结合力, 使得血清中吗啡游离分子的相对含量快速增加, 导致吗啡活性短时间内迅速增强, 并且乙醇存在条件下吗啡代谢时间明显延长, 血液中的吗啡能够长时间维持在较高浓度水平, 继而产生强的协同作用. 上述大鼠体内实验结果与基于光谱分析得出的结论相一致.

吗啡体内代谢产生的中间产物吗啡-6-葡萄糖苷酸(morphine-6-glucuronide, M-6-G)在体内的生物活性远远强于吗啡, 在吗啡镇痛、成瘾、耐受等生理过程中发挥着特殊作用. 基于此, 本文在分析大鼠心血中吗啡浓度随时间变化的同时, 也对M-6-G心血中的浓度随时间变化关系进行了研究. 如图10所示, 大鼠体内实验结果显示不同浓度乙醇条件下的大鼠心血血清中M-6-G的浓度也显示出较大的不同. 吗啡单独给药时, M-6-G在给药18 min后血液中浓度迅速达到峰值, 并且其浓度相对最高, 给药24 min时浓度迅速降低至最低, 这与单独吗啡给药时大鼠体内显示出的吗啡的半衰期短的特点相一致. 与此同时, 在乙醇和吗啡同时给药情况下M-6-G心血中的浓度则呈现缓慢增加的趋势, 且能够在血液中长时间维持较高浓度, 给药60 min后仍然显示出较高的游离浓度. 基于此, 吗啡与乙醇同时给药情况下M-6-G的生物活性作用时间更长, 药效更强, 再与吗啡的活性相叠加使得主观感受更加强烈, 这可能是吗啡与乙醇同时摄入时机体产生协同作用的重要原因之一.

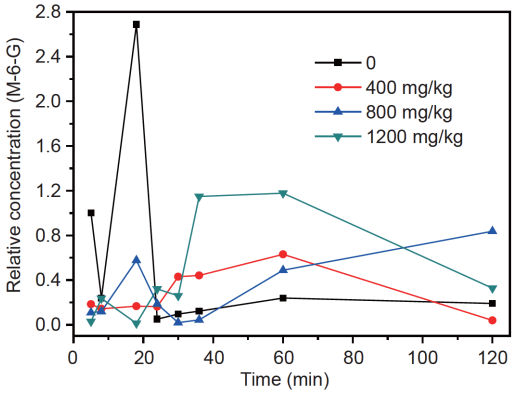


图 10　不同浓度乙醇条件下乙醇和吗啡同时腹腔给药时大鼠心血血清中吗啡-6-葡萄糖醛酸苷随时间变化曲线. 每个点均为5次平行实验的平均值, 相对浓度值均是相对于吗啡单独给药5 min时吗啡-6-葡萄糖醛酸苷血血清中的浓度的相对值(网络版彩图)

Figure 10　Effect of various concentrations of ethanol on M-6-G in heart blood of mouse under the conditions of intraperitoneal administration of ethanol and morphine. Each point is the average of 5 parallel experiments. The relative concentration values are relative to the concentration of morphine in the blood serum of M-6-G only (color online).

4 结论

综上所述, 本文通过紫外-可见光谱、荧光光谱、圆二色谱等光谱分析技术研究了在模拟生理环境条件下阿片类毒品吗啡、海洛因与HSA的相互作用机制以及不同浓度的乙醇对吗啡、海洛因与HSA相互作用的影响. 此外, 在光谱分析实验的基础上, 还通过大鼠体内实验进一步探索了心血中不同浓度的乙醇对吗啡始端代谢的影响. 研究结果显示, 阿片类毒品吗啡、海洛因淬灭HSA荧光的机制是静态淬灭, 能够形成较为稳定的吗啡-HSA、海洛因-HSA络合物. 在一定浓度范围内, 吗啡和海洛因可以在体内被血红蛋白存储、运输. 此外, 光谱分析研究结果还发现在体外模拟吗啡或海洛因与乙醇双重滥用的生理环境下, 不同浓度的乙醇(0.2~1.6 mg/mL)均可通过竞争的方式降低吗啡-HSA和海洛因-吗啡络合物的结合平衡常数, 增加血液中吗啡或海洛因游离分子的相对含量, 从而增强吗啡、海洛因在体内的药效和吸食者的主观感受, 继而产生协同作用. 与此同时, 大鼠体内实验结果也表明体内不同浓度的乙醇降低了吗啡和血液中血红蛋白的结合力, 使得血清中吗啡游离分子相对含量快速增加, 吗啡体内生物活性短时间内迅速增强, 并且吗啡代谢周期明显延长, 能够在血液中长时间维持在较高浓度水平, 产生强的协同作用. 大鼠体内实验结果还发现, 与吗啡单独给药条件下相比, 在乙醇和吗啡同时给药的情况下, 吗啡体内代谢产生的重要中间产物M-6-G在心血中的浓度呈现缓慢增加的趋势, 且能够在血液中长时间维持较高浓度, 生物活性持续时间更长、药效更强, 再与吗啡的活性相叠加使得吸食者主观感受更加强烈, 这可能也是吗啡与乙醇协同作用的重要原因之一. 海洛因与乙醇同时给药大鼠体内的实验以及乙醇与阿片类毒品同时给药时对阿片类毒品作用靶点影响的相关研究工作正在开展中.

参考文献

1 Jones JD, Mogali S, Comer SD. *Drug Alcohol Dependence*, 2012, 125: 8–18
2 Rudd RA, Aleshire N, Zibbell JE, Gladden RM. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2016, 64: 1378–1382
3 Gamage TF, Ignatowska-Jankowska BM, Muldoon PP, Cravatt BF, Damaj MI, Lichtman AH. *Drug Alcohol Dependence*, 2015, 146: 7–16
4 Schneider S, Provasi D, Filizola M. *Biochemistry*, 2016, 55: 6456–6466
5 Trigo JM, Martin-García E, Berrendero F, Robledo P, Maldonado R. *Drug Alcohol Dependence*, 2010, 108: 183–194
6 Matthes HWD, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dollé P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL. *Nature*, 1996, 383: 819–823
7 Traynor J. *Drug Alcohol Dependence*, 2012, 121: 173–180
8 Lam R, Gondin AB, Canals M, Kellam B, Briddon SJ, Graham B, Scammells PJ. *J Med Chem*, 2018, 61: 1316–1329
9 Cui SF, Li W, Zhou CH. *Am J Drug Alcohol Abuse*, 2018, 44: 321–328
10 Askgaard G, Hallas J, Fink-Jensen A, Molander AC, Madsen KG, Pottegård A. *Drug Alcohol Dependence*, 2016, 161: 258–264
11 Cui S, Wan J, Zhou C. *Chem J Chin U*, 2018, 39: 1178–1184 (in Chinese) [崔胜峰, 万敬伟, 周成合. 高等学校化学学报, 2018, 39: 1178–1184]
12 Rehm J, Dawson D, Frick U, Gmel G, Roerecke M, Shield KD, Grant B. *Alcohol Clin Exp Res*, 2014, 38: 1068–1077
13 Rehm J, Anderson P, Barry J, Dimitrov P, Elekes Z, Feijão F, Frick U, Gual A, Gmel G Jr, Kraus L, Marmet S, Raninen J, Rehm MX, Scafato E, Shield KD, Trapencieris M, Gmel G. *Eur Addict Res*, 2015, 21: 6–18
14 Pasternak GW, Pan YX, Sibley DR. *Pharmacol Rev*, 2013, 65: 1257–1317
15 Cui SF, Peng LP, Zhang HZ, Rasheed S, Vijaya Kumar K, Zhou CH. *Eur J Med Chem*, 2014, 86: 318–334
16 Cheng Y, Avula SR, Gao WW, Addla D, Tangadanchu VKR, Zhang L, Lin JM, Zhou CH. *Eur J Med Chem*, 2016, 124: 935–945
17 Sun H, Ansari MF, Battini N, Bheemanaboina RRY, Zhou CH. *Org Chem Front*, 2019, 6: 319–334
18 Liu HB, Gao WW, Tangadanchu VKR, Zhou CH, Geng RX. *Eur J Med Chem*, 2018, 143: 66–84
19 Zhang Y, Tangadanchu VKR, Cheng Y, Yang RG, Lin JM, Zhou CH. *ACS Med Chem Lett*, 2018, 9: 244–249
20 Wang LL, Battini N, Bheemanaboina RRY, Ansari MF, Chen JP, Xie YP, Cai GX, Zhang SL, Zhou CH. *Eur J Med Chem*, 2019, 179: 166–181
21 Lu Y, Gao S, Wang Y, Wang G, Yan C, Chen D. *Chin Sci Bull*, 2009, 54: 2071–2075 (in Chinese) [卢雁, 高胜华, 王运来, 王公轲, 闫长岭, 陈得军. 科学通报, 2009, 54: 2071–2075

22 Tunç S, Cetinkaya A, Duman O. *J PhotoChem Photobiol B-Biol*, 2013, 120: 59–65
23 Tunç S, Duman O, Bozoğlan BKı. *J Lumin*, 2013, 140: 87–94
24 Damu GLV, Wang QP, Zhang HZ, Zhang YY, Lv JS, Zhou CH. *Sci China Chem*, 2013, 56: 952–969
25 Wang LL, Battini N, Bheemanaboina RRY, Zhang SL, Zhou CH. *Eur J Med Chem*, 2019, 167: 105–123
26 Cui SF, Addla D, Zhou CH. *J Med Chem*, 2016, 59: 4488–4510
27 Hu YJ, Ou-Yang Y, Dai CM, Liu Y, Xiao XH. *Biomacromolecules*, 2010, 11: 106–112
28 Yin BT, Yan CY, Peng XM, Zhang SL, Rasheed S, Geng RX, Zhou CH. *Eur J Med Chem*, 2014, 71: 148–159
29 Yang XT, Wang YK, Wang Y, Jia J, Su XL, Gao XL. *Sci China Chem*, 2010, 40: 1091−1098 (in Chinese) [杨翊韬, 王越奎, 王炎, 贾杰, 苏晓玲, 高小丽. 中国科学: 化学, 2010, 40: 1091–1098]
30 Wu Q, Li CH, Hu YJ, Liu Y. *Sci Sin Chim*, 2010, 40: 435 (in Chinese) [吴琼, 李超宏, 胡艳军, 刘义. 中国科学: 化学, 2010, 40: 435]
31 Ye F, An YG, Qin DZ, Yang L, Yu, L, Xing RM. *Spectrosc Spect Anal*, 2007, 27: 321−324 (in Chinese) [叶锋, 安英格, 秦德志, 杨林, 佘岚, 邢瑞敏. 光谱学与光谱分析, 2007, 27: 321−324]

Molecular spectroscopic studies examining the synergistic mechanism of opioid morphine, heroin and ethanol

Shengfeng Cui[1*], Sujuan Ma[1], Jingwei Wan[1], Chenghe Zhou[2*]

[1] *Center for Traffic Evidence Technology, Department of Criminal Science and Technology, Railway Police College, Zhengzhou 450053, China;*
[2] *Key Laboratory of Applied Chemistry of Chongqing Municipality, Institute of Bioorganic & Medicinal Chemistry, School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China*
**Corresponding authors (email: cuishengfeng@rpc.edu.cn; zhouch@swu.edu.cn)*

Abstract: The research on the synergy caused by the dual abuse of opioids and ethanol has been one of the highly attractive topics in the fields of chemistry, pharmacy and forensic science. Based on spectral analysis and *in vivo* experiments in rats, this article systematically explored the synergistic mechanism. The results show that different concentrations of ethanol in the blood can reduce binding equilibrium constants of morphine-HSA and heroin-HSA complexes to varying degrees in the early stages of morphine and heroin metabolism. The concentration of free morphine and heroin in the blood is rapidly increased in a short time, the metabolic process is obviously slowed down, and the high concentration level can be maintained in the blood for a long time, thereby enhancing the efficacy of morphine and heroin in the body and the subjective feelings as well producing a synergistic effect. At the same time, the concentration of the more active morphine metabolic intermediate M-6-G in the blood shows a tendency to increase slowly, further strengthening the synergy between morphine and ethanol.

Keywords: heroin, morphine, spectroscopic analysis, ethanol, synergy

doi: 10.1360/SSC-2019-0095