文章编号：1000-7032(2010)02-0285-06

环丙沙星、氧氟沙星同时与牛血清白蛋白分子作用的荧光光谱

刘保生，薛春丽，王 晶，杨 超，吕运开
（河北大学理化分析中心 药物化学与分子诊断教育部重点实验室，河北 保定 071002）

摘要： 在 pH = 7.40 的水溶液中，环丙沙星（CPFX）、氧氟沙星（OFLX）能够猝灭牛血清白蛋白（BSA）的荧光。当两种药物共存时 BSA 荧光被进一步猝灭。据此建立了利用荧光发光光谱法进行喹诺酮类药物 CPFX 与 OFLX 间相互作用的研究。结果表明：药物间存在相互作用，使药物与蛋白间的结合常数减小、结合稳定性下降，游离型药物含量增加，造成药效增强；药物对蛋白荧光的猝灭属于静态猝灭，药物与蛋白结合位点数约为1。根据 Förster 非辐射能量转移理论，确定了药物与蛋白之间的结合距离 $r<7$ nm，属于非辐射能量转移。药物间的相互作用使 r 值增加，结合距离增大。同步荧光光谱研究表明药物间的相互作用对蛋白构象产生影响，使蛋白质分子伸展，疏水性降低。

关 键 词： 环丙沙星；氧氟沙星；牛血清白蛋白；荧光光谱；相互作用
中图分类号： O482.31；O657.3 **PACS：** 87.64.Ni **PACC：** 8715M **文献标识码：** A

1 引 言

从生物药物学的观点出发，血清白蛋白是血浆中最为丰富的重要载体蛋白，约占人血浆蛋白的60%，它能与许多内源或外源性化合物结合。药物进入人体后正是通过血浆的贮存与运输才能到达受体部位，进而发生药理作用[1~3]，随着药代动力学及临床药理学的迅猛发展，关于药物与蛋白质结合对药代动力学的影响，人们又有了更深刻的认识。因此，研究药物与血清白蛋白的相互作用不仅对于阐明药物的运输与代谢过程非常重要，而且对于阐明药物机理、药物动力学和药物毒性都具有重要意义。目前，有关表征血清白蛋白与药物反应机理的研究已有报道[4~6]。已有的报道中，研究一种药物与血清白蛋白反应的较多[7,8]，都是根据荧光猝灭求得反应的结合常数和结合位点数，由热力学常数来确定反应物二者之间的作用力类型。药物相互作用分为拮抗作用和协同作用，分别指合并用药与单独用药相比较，药效的增强（1 + 1 > 2）和减弱（1 + 1 < 2）[9]。药物间的相互作用通常是通过比较对动物或细胞合并用药与单独用药的数据进行研究[10,11]，研究周期长、费用高。CPFX、OFLX 均属于第三代喹诺酮类抗菌药。CPFX 抗菌活性是目前应用的几种主要喹诺酮类品种中最高者[12]。OFLX 对包括厌氧菌在内的革兰氏阳性菌和包括铜绿假单胞菌在内的革兰氏阴性菌均有较强的抗菌活性，且不良反应小[13]。本文利用荧光光谱研究了两种喹诺酮药物同时与 BSA 之间的相互作用，对合理用药有一定的指导意义。

2 实 验

2.1 仪器和试剂

RF-540 荧光分光光度计（日本岛津）；F-4500 荧光分光光度计（日本日立）；UV-265 紫外-可见分光光度计（日本岛津）；pHS-3C 型精密酸度计（上海雷磁仪器厂）。

CPFX、OFLX：中国兽医药品监察所提供（≥99.9 %），均配成浓度为 1.0×10^{-3} mol/L 的储备液；BSA（≥99 %，上海蓝季科技发展有限公司），配成浓度为 1.0×10^{-4} mol/L 的储备液，用时逐级稀释至所需浓度；pH = 7.40 的 Tris-HCl 缓

收稿日期： 2009-11-25；**修订日期：** 2010-01-24
基金项目： 国家自然科学基金（200675024）资助项目
作者简介： 刘保生（1963 - ），男，河北保定人，主要从事分子发光学理论与应用的研究。
E-mail：lbs@hbu.edu.cn，Tel：（0312）5079385

冲溶液;0.1 mol/L NaCl 水溶液(用以维持生理条件下的离子强度)。所用试剂均为分析纯,实验用水为二次石英蒸馏水。

2.2 实验方法

2.2.1 BSA-CPFX(BSA-OFLX)体系

于10 mL 比色管中依次加入 1.0 mL 0.1 mol/L NaCl、2.0 mL Tris-HCl 缓冲溶液(pH = 7.40)、1.0 mL 1.0×10^{-5} mol/L BSA 溶液和不同浓度的 CPFX 或 OFLX,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀。在狭缝带通宽度皆为 10 nm,荧光激发波长 286 nm,发射波长 340 nm 下扫描荧光光谱或测定荧光强度 F,同时以不含药物的 BSA 溶液荧光强度为 F_0,分别讨论药物单体 CPFX 或 OFLX 对 BSA 的荧光猝灭作用。

2.2.2 BSA-CPFX-OFLX(BSA-OFLX-CPFX)体系

于10 mL 比色管中依次准确加入1.0 mL 0.1 mol/L NaCl、2.0 mL Tris-HCl 缓冲溶液(pH = 7.40)、1.0 mL 1.0×10^{-5} mol/L BSA 溶液和 1.0 mL 1.0×10^{-5} mol/L 的 CPFX(或 OFLX)溶液,分别加入不同浓度的 OFLX(或 CPFX),用蒸馏水稀释至刻度,摇匀,在室温下放置约 30 min,以不含 OFLX 的 BSA-CPFX 溶液荧光强度为 F_0,讨论 CPFX 存在时 OFLX 对 BSA 的荧光猝灭作用。同理,以不含 CPFX 的 BSA-OFLX 溶液荧光强度为 F_0,讨论 OFLX 存在时 CPFX 对 BSA 的荧光猝灭作用。测定条件同2.2.1。

3 结果与讨论

3.1 药物与 BSA 的荧光猝灭反应

CPFX、OFLX 与 BSA 以及混合体系荧光猝灭反应的荧光光谱,见图1、图2,可知随着药物浓度的增加,BSA 的荧光强度依次降低,且 BSA 最大发射波长的吸收峰略有红移现象,表明药物对 BSA 的荧光有猝灭作用且猝灭过程为静态猝灭。为研究猝灭机理,将猝灭数据按 Stern-Volmer 方程[14,15]:

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

F_0、F 分别为无、有猝灭剂时的荧光强度;τ_0:生物大分子平均荧光寿命约为 10^{-8} s;K_{sv}: Stern-Volmer 猝灭常数;$[C]$:猝灭剂的浓度,处理结果见表1。猝灭速率常数 K_q 值都远大于 2.0×10^{10} L/mol·s(最大扩散碰撞猝灭常数),进一步证实猝灭不是由于碰撞引起的动态猝灭,而是形成了化合物而引起的静态猝灭,在静态猝灭作用中,在 BSA 溶液中加入不同浓度的药物时,其荧光强度变化遵从[16]:

$$\lg[(F_0 - F)/F] = n\lg K_A + n\lg[Q],$$
$$[Q] = \{[C] - (F_0 - F)[Pt]/F_0\}, \quad (2)$$

其中,$[Pt]$为 BSA 浓度,以 $\lg[(F_0 - F)/F]$对 $\lg[Q]$作图可得一直线,从而求得 CPFX、OFLX 与蛋白的结合常数 K_A 及结合位点数 n,见表1。可知,①由相关系数 r 可以看出,各曲线线性良好;结合位点数都约为1;②$K_{A(BSA\text{-}OFLX)}/K_{A(BSA\text{-}CPFX)}$ = 1.69,表明 OFLX 与 BSA 结合能力比 CPLX 与 BSA 的结合能力强;③按实验方法 2.2.2 操作得 CPFX 存在时 OFLX 与 BSA 结合常数 $K_{A(BSA\text{-}CPFX\text{-}OFLX)}$ 值,此时 $K_{A(BSA\text{-}CPFX\text{-}OFLX)}/K_{A(BSA\text{-}OFLX)}$ = 0.85,表明 CPFX 可以使 OFLX 与 BSA 的结合稳定性减弱,即 CPFX 的存在使游离的 OFLX 增加;同理可得 OFLX 存在时 CPFX 与 BSA 结合常数 $K_{A(BSA\text{-}OFLX\text{-}CPFX)}$ 值,此时 $K_{A(BSA\text{-}OFLX\text{-}CPFX)}/K_{A(BSA\text{-}CPFX)}$ =0.91,表明 OFLX

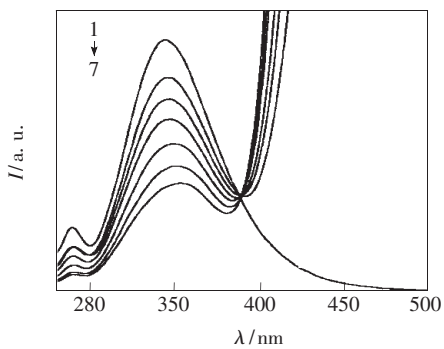

图1 BSA-OFLX 体系荧光猝灭光谱

Fig. 1 Quenching fluorescence spectra of BSA-OFLX C_{BSA} = 1.0×10^{-6} mol/L, 1-7: C_{OFLX} = (0.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0) $\times10^{-5}$ mol/L.

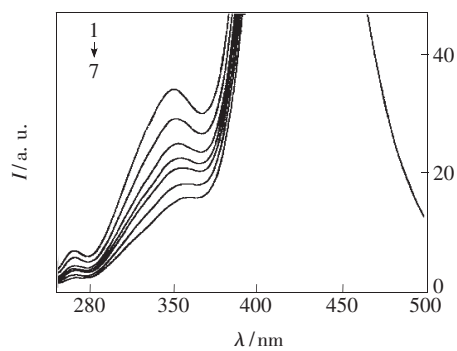

图2 BSA-CPFX-OFLX 体系荧光光谱

Fig. 2 Quenching fluorescence spectra of BSA-CPFX-OFLX C_{BSA} = 1.0×10^{-6} mol/L, C_{CPFX} = 1.0×10^{-5} mol/L, 1 ~ 7: C_{OFLX} = (0.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0) $\times10^{-5}$ mol/L.

表 1　药物与 BSA 的猝灭反应参数

Table 1　Quenching reactive parameter of BSA and drugs

体系	K_q(L/mol · s)	r_a	K_A(L/mol)	r_b	n
BSA-OFLX	8.53×10^{13}	0.998 1	5.64×10^{4}	0.998 1	1.41
BSA-CPFX	4.54×10^{12}	0.997 7	3.34×10^{4}	0.996 9	1.37
BSA-OFLX-CPFX	5.94×10^{12}	0.997 3	3.04×10^{4}	0.997 9	1.17
BSA-CPFX-OFLX	7.26×10^{12}	0.998 4	4.79×10^{4}	0.996 3	1.39

r_a、r_b 分别为 $F_0/F\sim[C]$ 与 $\lg[(F_0-F)/F]\sim\lg[Q]$ 曲线的相关系数

也使 CPFX 与 BSA 的结合稳定性下降。以上结论证明：OFLX 与 CPFX 共存时，产生相互作用对药效产生一定的影响。

3.2　荧光给体与受体间结合距离

荧光能量转移可分为辐射能量转移和非辐射能量转移。辐射能量转移，使物质的荧光光谱畸形。图 1、2 中 BSA 的荧光光谱没有畸变，因此 BSA 与药物之间的能量转移不应为辐射能量转移。非辐射能量转移包括分子内能量转移和分子间能量转移，若供能体与受能体结合生成了复合物，则两者之间的能量转移为分子内能量转移，否则为分子间能量转移。由上述分析可知，BSA 与药物之间的能量转移应属于分子内的非辐射能量转移。

根据偶极-偶极非辐射能量转移机理，能量给体与能量受体间距离 r 与能量转移效率为 50% 时所对应的临界能量转移距离 R_0 及能量转移效率 E 之间有如下关系[17]：

$$r = R_0(E^{-1}-1)^{1/6}, \tag{3}$$

$$R_0^6 = 8.78\times10^{-25}K^2\Phi N^{-4}J, \tag{4}$$

式中，K^2 为取向因子，取给体与受体各向随机分布的平均值 2/3；N 是溶剂的折射率，取水和有机物的平均值 1.336；Φ 为当无受体存在时能量给体的荧光量子产率，取 BSA 中色氨酸残基的量子产率0.118[18]；J 为供能体的荧光发射光谱和受能体的紫外吸收光谱之间光谱的重叠积分（图 3 阴影部分），且有

$$J = \sum F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4\Delta\lambda/\sum F(\lambda)\Delta\lambda, \tag{5}$$

通过自行设计计算程序处理数据得出 J 值，$F(\lambda)$ 为给体在波长 λ 处的荧光强度，$\varepsilon(\lambda)$ 为受体在波长 λ 处的摩尔吸光系数，单位 L/mol · cm；λ 波长，单位 cm。由临界转移距离 R_0 和实验测得能量转移效率：

$$E = 1 - F/F_0, \tag{6}$$

可以计算出能量给体与受体间的距离 r。见表 2。在实验条件下，BSA 的荧光主要来自第 212 位的

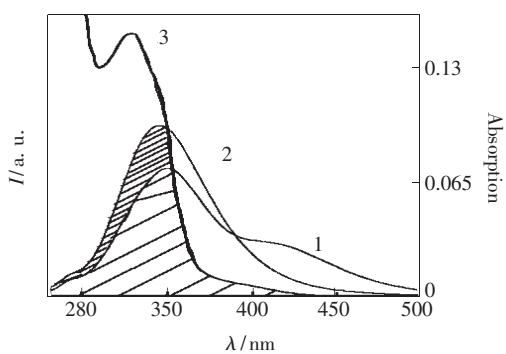

图 3　BSA-CPFX、BSA 的荧光光谱及 OFLX 的吸收光谱

Fig. 3　Fluorescence spectra for BSA, BSA-CPFX, and absorbance spectra of OFLX, 1. fluorescence of BSA-CPFX; 2. fluorescence of BSA; 3. absorption of OFLX; $C_{BSA}=C_{CPFX}=C_{OFLX}=1.0\times10^{-5}$ mol/L.

表 2　药物与 BSA 间 E%及 J、R_0、r 参数

Table 2　Parameters of E%, J, r, R_0 between drugs and BSA

体系	E/%	J/(cm^3 · L · mol^{-1})	R_0/nm	r/nm
BSA-OFLX	40.03	4.64×10^{-14}	2.96	3.17
BSA-CPFX-OFLX	39.01	4.04×10^{-14}	2.75	3.12
BSA-CPFX	25.91	4.48×10^{-14}	2.94	3.65
BSA-OFLX-CPFX	22.84	3.24×10^{-14}	2.98	3.51

色氨酸残基[19],该残基位于 BSA 的疏水腔内,所求得的 r 值为结合部位与该残基之间的距离。OFLX、CPFX 脂溶性较差,比较难以进入疏水腔,结合位置距该色氨酸残基较远,因此其 r 值较疏水性药物盐酸川穹嗪($r=1.8$ nm)[20]要大。BSA-CPFX-OFLX 比 BSA-OFLX 体系 r 值增加,表明 CPFX 使 BSA、OFLX 间结合距离增加、稳定性减小,BSA-OFLX-CPFX 与 BSA-CPFX 体系比较也有相同的结论。r 值的变化也表明两种药物间的相互作用。

3.3 药物对 BSA 构象的影响

同步荧光谱因具有简化光谱、窄化谱带和减小光谱重叠等优点而常用来探讨蛋白质构象的变化[21]。对于蛋白质的同步荧光光谱,$\Delta\lambda=15$ nm 时仅表现酪氨酸残基(Tyr)的荧光特性;$\Delta\lambda=60$ nm 仅表现色氨酸残基(Trp)的荧光特性,由于蛋白质中 Tyr、Trp 的最大荧光发射波长与其所处环境的疏水性有关,随其所处环境的疏水性降低,其最大发射波长逐渐红移,因此由最大发射波长的改变可以判断蛋白质构象的变化[22]。扫描不同体系的同步荧光光谱,见图4,位移数据见表3。表明①CPFX 主要影响 BSA 的 Trp,而 OFLX 主要影响 BSA 的 Tyr。②BSA-CPFX-OFLX 与 BSA-OFLX 体系,BSA-OFLX-CPFX 与 BSA-CPFX 体系比较,同步荧光光谱的变化,进一步证明药物间相互作用的存在。

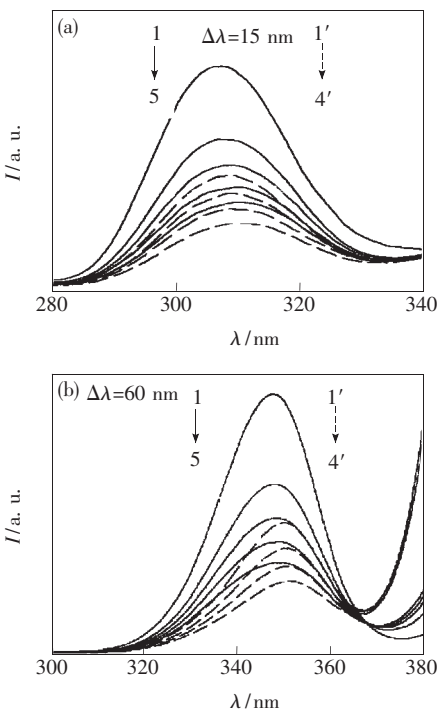

图4 BSA-OFLX、BSA-CPFX-OFLX 同步荧光光谱

Fig. 4 Synchronous fluorescence spectra of BSA-OFLX and BSA-CPFX-OFLX $C_{BSA}=1.0\times10^{-5}$ mol/L, 1~5: $C_{OFLX}=(0.0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5)\times10^{-5}$ mol/L, 1′~4′: $C_{CPFX}=1.0\times10^{-5}$ mol/L, $C_{OFLX}=(1.0, 1.5, 2.0, 2.5)\times10^{-5}$ mol/L.

以上讨论表明:OFLX 和 CPFX 间存在相互作用,对蛋白质的构象产生影响,且随着药物浓度的增加,药物与 BSA 作用改变了 BSA 上 Tyr 和 Trp 所处的微环境,使 BSA 腔内疏水环境的极性增大疏水性降低,BSA 内部的疏水结构有所瓦解,亲水性增加,肽链的伸展程度增加[23]。高浓度药物使蛋白质分子伸展,降低了氨基酸残基间的能量传递,使两者荧光强度降低。

表3 体系同步荧光光谱 Tyr-Trp 残基位移数据

Table 3 Dates of synchronous fluorescence spectra nm

体系	Tyr	Trp	体系	Tyr	Trp
BSA-OFLX	3	2	BSA-CPFX	1	4
BSA-CPFX-OFLX	0	2	BSA-OFLX-CPFX	1	2

4 结 论

研究表明:CPFX 与 OFLX 间存在相互作用,相互作用结果使药效增强。利用荧光光谱研究药物与血清白蛋白间的结合常数、结合距离及同步荧光光谱等的变化,能够研究某些药物间的相互作用,进而研究药物共存对药效的影响。方法简单、快速、准确,可以为药物的药理研究及临床联合用药提供理论依据。但不能用于既不与蛋白作用又无荧光发射的药物间相互作用的研究。

参 考 文 献:

[1] Shao Shuang, Ma Boying, Wang Xuejie, *et al.* Study on the interaction between cefodium sodium and serum albumin [J]. *Acta Phys. Chim. Sin.* (物理化学学报), 2005, **21**(7):792-795 (in Chinese).

[2] Mathias U, Jung M. Determination of drug-serum protein interactions via fluorescence polarization measurements [J]. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **388**(5-6):1147-1156.

[3] Rus' O B, Puchkaev A V, Ivanov A I, *et al.* Interaction of albumins and hemin with aromatic antioxidants: A spectrophotometric and fluorometric study [J]. *Appl. Biochem. Micro.*, 2006, **36**(1):36-45.

[4] Smyk B. Fluorescence study of sinapic acid interaction with bovine serum albumin and egg albumin [J]. *J. Fluoresc.*, 2003, **13**(4):349-356.

[5] Bai Haixin, Yang Cheng, Yang Xiurong. Interaction between bovine serum albumin and Indo-1 using fluorescence spectroscopic method [J]. *Chem. J. Chinese Univ.* (高等学校化学学报), 2007, **28**(2):227-332 (in Chinese).

[6] Feng Xizeng, Bai Chunli, Lin Zhang. The interaction between acridine orange and bovine serum albumin [J]. *Anal. Chem.* (分析化学), 1998, **26**(2):154-157 (in Chinese).

[7] Long Xiufen, Liu Shaopu, Kong Ling, *et al.* A study on the interaction of proteins with some heteropoly compounds and their analytical application by resonance Rayleigh scattering method [J]. *Talanta*, 2004, **63**(2):279-286.

[8] Gong Aiqin, Zhu Xiashi, Hu Yanyan, *et al.* A fluorescence spectroscopic study of the interaction between epristeride and bovine serum albumin and its analytical application [J]. *Talanta*, 2007, **73**(4):668-673.

[9] Zhang Qingzhu. *Fundamental Pharmacology* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2006, 48.

[10] Zhou Xiumei, Yang Wenbin, Chai Qiuyan. Studies of general pharmacological experiment on danshen injection [J]. *Shanxi Med. J.* (山西医药学杂志), 2004, **33**(12):1028-1030 (in Chinese).

[11] Li Xin, Gong Zehui, Chi Mugen, *et al.* Screening of ET-1receptor antagonists and the pharmacological evaluation [J]. *Chin. Pharmacological Bulletin.* (中国药理学通报), 2008, **24**(11):1422-1426 (in Chinese).

[12] Zhang Xiaowei, Zhao Fenglin, Li Kean. Studies on the reaction between ciprofloxacin and bovine serum albumin [J]. *Chem. J. Chin. Univ.* (高等学校化学学报), 1999, **20**(7):1063-1067 (in Chinese).

[13] Zou Jun, Li Xinxin, Yang Zhaoxu, *et al.* In vitroactivities of levofloxacin against helicobacter pylori [J]. *J. Chin. Antibiotics.* (中国抗生素杂志), 2003, **28**(5):292-294 (in Chinese).

[14] Zhang Hongmei, Wang Yangqing, Yu Liming, *et al.* Spectroscopic study on interaction between zinc phthalocya-nine and bovine hemoglobin (BHb) [J]. *Chemical Reagents* (化学试剂), 2008, **30**(2):85-88 (in Chinese).

[15] Wei Yanli, Li Jianqing, Dong Chuan, *et al.* Investigation of the association behaviors between biliverdin and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy [J]. *Talanta*, 2006, **70**(2):377-382.

[16] Sun Yantao, Zhang Haitao, Sun Ye, *et al.* Study of interaction between protein and mainactive components in citrus aurantium L. by optical spectroscopy [J]. *J. Lumin.*, 2010, **130**(2):270-279.

[17] Jiang Zhiqiang, Chi Yanhua, Zhuang Jia, *et al.* Mechanism studies on the combination Reaction between bovine serum albumin and zincon by fluorescence spectra [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis* (光谱学与光谱分析), 2007, **27**(5):986-990 (in Chinese).

[18] Pu Yingqiu, Tao Weibo. Studies on the interaction between seratrodastand bovine serum album in by fluorescence spectroscop [J]. *Phamaceutical and Clinical Research* (药学与临床研究), 2007, **15**(4):287-291 (in Chinese).

[19] Ge Feng, Wang Jianping, Liu Diqiu, *et al.* Study on interaction between shikonin and bovine serum albumin by fluorescence spectra [J]. *The Chinese Journal of Process Engineering* (过程工程学报), 2009, **9**(1):118-122 (in Chinese).

[20] Huang Bo, Zou Guolin, Yang Tianming. Studies on the interaction between adriamycin and bovine serum albumin [J]. *Acta Chimica Sinica* (化学学报), 2002, **60**(10):1867-1871 (in Chinese).

[21] Wu Xiaohong, Zhou Jiahong, Gu Xiaotian, *et al.* Study on interaction between hypocrellin A and hemoglobin or myoglobin using synchronous fluorescence spectra [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis* (光谱学与光谱分析), 2006, **26**(12): 2287-2290 (in Chinese).

[22] Chen Daiwu, Xie Qingji, Jiang Xueqin, *et al.* Inreraction of quercetion with casein and bovine serum albumin as well as effects of coexisting carbon nanotubes [J]. *Acta Phys. Chim. Sin.* (物理化学学报), 2008, **24** (3):379-387 (in Chinese).

[23] Yan Chengnong, Zhang Huaxin, Liu Yi, *et al.* Fluorescence spectra of the binding reaction between paraquat and bovine serum albumin [J]. *Acta Chimica Sinica* (化学学报), 2005, **63**(18):1727-1732 (in Chinese).

Studies on the Interaction between Ciprofloxacin and Ofloxacin in Presence of Bovine Serum Albumin by Spectroscopic Methods

LIU Bao-sheng, XUE Chun-li, WANG Jing, YANG Chao, LU Yun-kai

(*Key Laboratory of Medical Chemistry and Molecular Diagnosis*, *Ministry of Education*, *Center of Physics and Chemistry*, *Hebei University*, *Baoding* 071002, *China*)

Abstract: In the aqueous solution of pH = 7.40, both ciprofloxacin (CPFX) and ofloxacin (OFLX) can quench fluorescence of bovine serum albumin (BSA). The fluorescence intensity is obviously gone down when the two drugs coexist. According to this, studies were established on the interaction between CPFX and OFLX by fluorescence spectrum. It was proved that the interaction between the drugs reduces the binding stability of the drug and protein. At the same time, increase of the free drug concentration will increase the effect of the drugs. The result showed that the quenching mechanism of the combination of bovine serum albumin and drugs is a static procedure. The number of binding sites is 1 in several of system. Based on the theory of Förester spectroscopy energy transfer, the binding distance ($r < 7.0$ nm) between the drugs and BSA was obtained. It belongs to non-radiation energy transfer. Because of the existence of interaction between the drugs, the correlation coefficient and binding distance are increased. Studies by synchronous spectra show the effect of the interaction between the drugs on conformation of BSA. It makes protein molecules extend and hydrophobic nature reduces.

Key words: ciprofloxacin; ofloxacin; bovine serum albumin; fluorescence spectra; interaction

CLC number: O482.31; O657.3 **PACS**: 87.64.Ni **PACC**: 8715M **Document code**: A

Received date: 2009-11-25