

荧光法研究左氧氟沙星与人血清白蛋白 作用机理及含量测定

陈玉海 张彦青^a 赵风利^a 刘保生^a

(保定职业技术学院 河北省保定市 071051)

^a(河北大学理化分析中心 河北省保定市五四东路 180 号 071002)

摘 要 利用荧光及紫外光谱法研究了水溶液体系中左氧氟沙星(LVFX)与人血清白蛋白(HSA)的相互作用机制。结果表明左氧氟沙星对人血清白蛋白的荧光有较强的猝灭作用,其猝灭类型主要为静态猝灭。在不同温度下求得了左氧氟沙星与人血清白蛋白的结合常数 k ,发现随反应温度上升 k 值下降。由热力学参数,确定了左氧氟沙星与人血清白蛋白的结合作用主要为色散力。用同步荧光技术考察了左氧氟沙星对人血清白蛋白构象的影响,又根据Foerster理论,测得了左氧氟沙星与人血清白蛋白结合的能量转移效率,相互结合距离。进一步证明了该反应是单一静态猝灭过程,阐述了其猝灭机理是通过能量转移产生的。研究发现人血清白蛋白荧光猝灭程度的对数与左氧氟沙星含量有良好的线性关系,25℃时线性范围为: $2.0 \times 10^{-6} \sim 2.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,检出限为 $1.2 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。用于片剂中左氧氟沙星含量的测定结果满意,相对标准偏差为:1.5%—2.1%,回收率为:94.8%—97.7%。

关键词 荧光猝灭,左氧氟沙星,人血清白蛋白,机理。

中图分类号:O 657.32

文献标识码:B

文章编号:1004-8138(2008)02-0185-05

1 前言

白蛋白是主要的血清蛋白,可与许多内源性或外源性化合物结合,从不同角度研究其与小分子的相互作用,对于阐明药物的运输与代谢过程及了解蛋白质的结构与功能是很重要的。药物进入人体后,总要通过血浆的贮存和运输,到达受体部位并发生药理作用,多数有机药物在血浆中都或多或少地与血浆蛋白(主要是白蛋白)结合,结合后的药物不易穿透毛细血管壁,限制其进一步运输,这对药物在体内的代谢和分布产生了重要影响。另外,药物与白蛋白结合后,使药物存留于血浆中,以减弱药物的最大作用强度,防止作用大幅度波动以及延长药物的作用时间^[1,2]。因此,研究药物与白蛋白的结合是药物动力学及临床药理学的重要内容,已经成为引人注目的课题。荧光法是研究生物大分子与小分子、离子相互作用的重要手段。荧光测试中的发射峰特征、荧光偏振、能量转移及荧光寿命等指标可以对蛋白质分子中荧光生色基团的结构及其所处的微环境提供有用的信息。左氧氟沙星是喹诺酮类广谱抗菌剂。对革兰阴性菌、革兰阳性菌及部分厌氧菌均显示强力的杀菌活性。对耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌、耐氨基青霉素的流感杆菌及吡哌酸的大肠杆菌及对其他药物耐药的细菌的抗菌效力优于大环内酯类抗生素。本文应用荧光技术对LVFX与HSA之间的结合反应及能量转移效率进行了研究,得出了LVFX与HSA结合反应的结合常数、结合热力学函数参数,为探讨在LVFX作用下HSA构型的变化,阐明LVFX在人体内的储存方式、传输机制及药理作用

联系人,电话:(0312)5079385;E-mail:baoshengliu2003@163.com

作者简介:陈玉海(1963—),男,河北省保定市人,高级讲师,主要从事分析化学研究工作。

收稿日期:2007-12-11;接受日期:2007-12-26

等提供重要信息。这对阐明药物在体内的输送和代谢过程,了解药物分子在生物体中的作用是很重要的。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

RF-540 型荧光光度计(带恒温装置,日本岛津公司);UV-265 型紫外分光光度计(日本岛津公司);人血清白蛋白(HSA)水溶液(北京双旋微生物基地):称取0.0680g于100mL容量瓶中,以水定容,浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;左氧氟沙星(LVFX)水溶液:准确称取一定量经105℃恒重的左氧氟沙星对照品(中国药品生物制品检定所),配成 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水溶液;三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)缓冲溶液: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH=7.40;NaCl水溶液: $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,实验中NaCl溶液的浓度均保持在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,用以维持离子强度。所用试剂均为分析纯,实验用水为去离子的二次蒸馏水。

2.2 实验方法

于10mL比色管中依次加入 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl和pH=7.40 Tris-HCl缓冲溶液各2.0mL、 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的HSA 1.0mL和不同体积的 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LVFX溶液,用水稀释至刻度,摇匀,于恒温水浴中恒温10min,固定 $\lambda_{\text{ex}} = 284 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{em}} = 355 \text{ nm}$ 测定相对荧光强度 $\Delta F = F_0 - F$ (F_0 、 F ——分别为有LVFX和无LVFX存在时体系溶液荧光强度)。

3 结果与讨论

3.1 左氧氟沙星对HSA荧光猝灭的机理

蛋白质的内源荧光来自于分子中色氨酸残基和酪氨酸残基,许多抗生素和有机小分子都是荧光猝灭剂。不同温度下,在蛋白质中加入LVFX后,蛋白质荧光发生有规律的猝灭,见图1。

根据蛋白质猝灭程度做Stern-Volmer曲线,曲线有良好的线性关系,随温度上升,Stern-Volmer曲线斜率降低见表1,故初步判断是静态猝灭。为了进一步证实此猝灭过程,按动态过程处理,其方程为^[3]: $F_0/F = 1 + K_s[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q]$,式中: K_s ——动态猝灭常数, K_q ——双分子猝灭过程速率常数, τ_0 ——猝灭剂不存在时生物大分子荧光平均寿命, $[Q]$ ——猝灭剂浓度。由上式可知 $K_s = K_q\tau_0$, $K_q = K_s/\tau_0$ 。由于生物大分子荧光寿命约为 10^{-8} s ,故由猝灭曲线斜率可求得不同温度时的猝灭常数,25、35和45℃时 K_q 分别为 5.35×10^{12} 、 5.16×10^{12} 和 $4.77 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,远远大于

各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,因此进一步证明此猝灭不是由动态碰撞引起的。利用静态猝灭公式^[3]: $(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + (KF_0[Q])^{-1}$ 。作不同温度下的Llew eaver-Burk曲线,由直线斜率求得不同温度下左氧氟沙星与HSA的结合常数 K ,25、35和45℃时分别为 2.48×10^6 、 2.23×10^6 和 $1.76 \times 10^6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,表明LVFX与HSA结合作用较强。同时在整个试验浓度范围内该直线具有良好的线性关系,说明LVFX与HSA的作用更符合静态猝灭的特征。

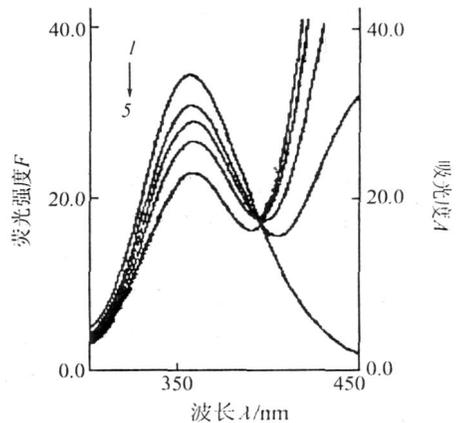


图1 LVFX对HSA荧光猝灭

$C_{\text{HSA}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $C_{\text{LVFX}} =$
(1—0; 2—1.0; 3—3.0;
4—5.0; 5—7.0) $\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 线性方程和相关系数

温度	线性方程	相关系数
动态猝灭		
25	$F_0/F = 0.98608 + 53538[Q]$	$r = 0.9974$
35	$F_0/F = 0.97712 + 51561[Q]$	$r = 0.9956$
45	$F_0/F = 0.98502 + 47691[Q]$	$r = 0.9963$
静态猝灭		
25	$(F_0 - F)^{-1} = 0.06822 + 3.22932 \cdot 10^{-6}[Q]^{-1}$	$r = 0.9994$
35	$(F_0 - F)^{-1} = 0.04207 + 3.42582 \cdot 10^{-6}[Q]^{-1}$	$r = 0.9993$
45	$(F_0 - F)^{-1} = 0.10017 + 3.59024 \cdot 10^{-6}[Q]^{-1}$	$r = 0.9994$

3.2 左氧氟沙星与HSA 结合的热力学性质

药物与生物大分子的作用力包括氢键、范德华力、静电引力、疏水作用力等。当温度变化不太大时,反应的焓变可看作一个常数,由 $\ln K_2/K_1 = \Delta H (1/T_1 - 1/T_2)/R$, $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K$, 可求得左氧氟沙星与HSA 结合的 ΔH 、 ΔS 分别为: $\Delta H = -8.11 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta S = -168 \text{ J} \cdot (\text{mol} \cdot \text{K})^{-1}$, $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$ 其作用力主要为静电引力; $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$ 其作用力主要为色散力,因此左氧氟沙星与HSA 之间的作用力主要为色散力^[4]。

3.3 左氧氟沙星与蛋白质间的能量转移

若小分子化合物与血清白蛋白的结合为顺序结合,则根据Foerster 非辐射能量转移机制,可以求出结合位置与蛋白质分子中产生荧光基团之间的距离,其转移效率与给体-受体间距离(r)及临界能量转移距离(R_0)有关,且给体与受体间能量转移效率^[5] $E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$, 式中 R_0 是能量转移效率为50%时的临界距离, $R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J$, 式中 K^2 为偶极空间取向因子, N 为介质的折射指数, Φ 为给体的荧光量子产率, J 为给体的荧光发射光谱与受体吸收光谱间的光谱重叠积分,见图2,即 $J = \int F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda / \int F(\lambda) \Delta\lambda$, $F(\lambda)$ 为荧光给体在波长 λ 处的荧光强度, $\epsilon(\lambda)$ 为受体在波长 λ 处的摩尔吸收系数,能量转移效率 E 通过实验可由下式求出: $E = 1 - F/F_0$ 。其中 F 、 F_0 分别为有受体与无受体时,给体的荧光强度。

在上述实验条件下,取 $K^2 = 2/3$, $N = 1.336$, $\Phi = 0.15$ ^[6], 将上述数值代入求算结果见表2, r 值均小于7nm,符合能量转移理论。

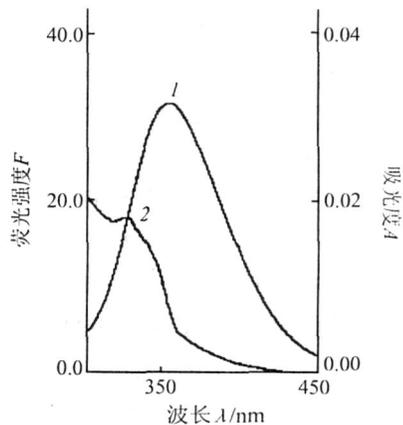


图 2 HSA 的荧光光谱(1)和左氧氟沙星的吸收光谱(2)
 $C_{\text{HSA}} = C_{\text{LVFX}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

表 2 LVFX 与HSA 作用能量转移参数J, E, R₀ 和r

温度	R_0	E	r	J
()	(nm)	(%)	(nm)	($\text{cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$)
25	2.75	10	3.97	1.58×10^{-14}
35	3.07	11	4.35	3.06×10^{-14}
45	3.12	9.3	4.58	3.40×10^{-14}

3.4 左氧氟沙星对蛋白质构象的影响

同步荧光光谱可用于蛋白质构象变化的分析^[7]。由 $\Delta\lambda = 15\text{nm}$ 所做出的同步荧光光谱只显示蛋白质中酪氨酸残基的光谱特性,而 $\Delta\lambda = 60\text{nm}$ 同步荧光光谱只表示蛋白质中色氨酸残基的荧光^[8]。因残基的最大发射波长与其所处环境之极性有关,故由发射波长的改变可判断蛋白质构象的变化。

固定蛋白质浓度, 逐步增加LVFX 的浓度, 绘制蛋白质的同步荧光光谱。图3 分别为蛋白质中酪氨酸和色氨酸残基的荧光光谱图。可以看出随左氧氟沙星浓度增大酪氨酸、色氨酸残基最大发射波长未发生变化, 表明蛋白质的构象未发生变化。

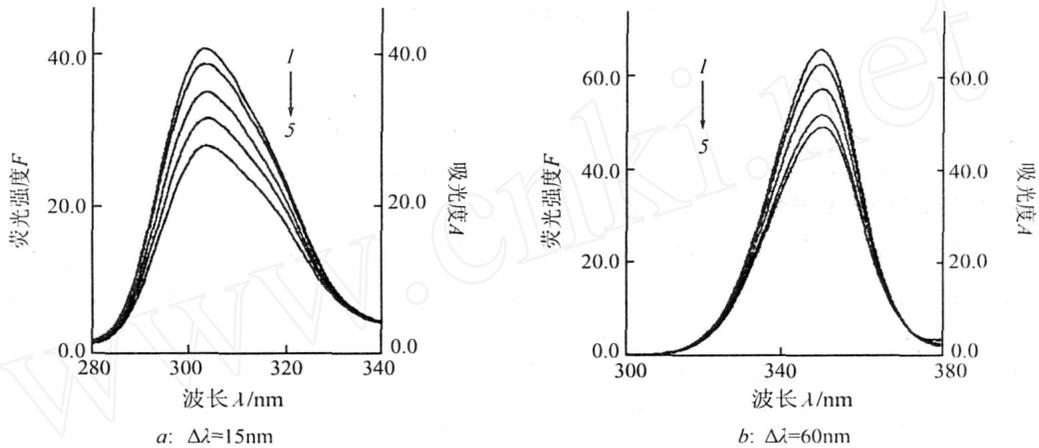


图3 左氧氟沙星猝灭HSA 的同步荧光光谱

$C_{HSA} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $C_{LVFX} = (0, 1, 0, 3, 0, 5, 0, 7, 0) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (I —5)

3.5 校准曲线

按实验方法操作, 将所得数据进行处理发现LVFX 猝灭血清白蛋白的程度 $\Delta F = F_0 - F$ 与LVFX 的含量不呈线性关系。但 $\lg F_0/F$ 与LVFX 的浓度线性关系良好, 数据见表3。

表3 不同温度下测定LVFX 的校准曲线及线性范围

	线性方程 $C/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	相关系数	线性范围 $(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
25	$\lg F_0/F = 0.04099 + 28778.8C$	0.9962	$2.0 \times 10^{-6} - 2.4 \times 10^{-5}$
35	$\lg F_0/F = 0.02798 + 29315.6C$	0.9973	$2.0 \times 10^{-6} - 2.4 \times 10^{-5}$
45	$\lg F_0/F = 0.05516 + 27288.3C$	0.9958	$2.0 \times 10^{-6} - 2.4 \times 10^{-5}$

可知利用HSA 荧光猝灭, 可测定药物中LVFX 的含量, 25 时该方法检出限为 $1.2 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。实验表明药物中所含赋形剂等不干扰LVFX 的测定。

3.6 药物中LVFX 含量的测定

25 时, 取不同厂家或批号的LVFX 片各1粒(标示量皆为100mg), 在250mL 容量瓶中用超声波助溶, 自然沉降后, 取上清液1.0mL 稀释于50mL 容量瓶中。取该溶液2.0mL, 按实验方法进行测定药片中LVFX 的含量同时进行回收试验, 结果见表4。表明: 该方法用于片剂中LVFX 的含量的测定, 结果满意。

表4 LVFX 片LVFX 含量的测定结果

(n=6)

样品号	测定量 $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	标准加入量 $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	加标后测定量 $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
1	1.54	2.0	3.466	96.3	1.5
2	1.52	2.0	3.416	94.8	1.8
3	1.56	2.0	3.514	97.7	2.1

参考文献

[1] 苏忠, 秦川, 谢孟峡等. 罗布麻活性成分与人血清白蛋白结合的光谱学研究[J]. 化学学报, 2007, 65(4): 329.

- [2] 曹玺琨, 杜黎明 吡啶美辛与牛血清白蛋白结合作用的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(5): 973
- [3] 杨曼曼, 杨频, 张立伟 荧光法研究咖啡酸类药物与白蛋白的作用[J]. 科学通报, 1994, 39(1): 31.
- [4] 魏晓芳, 刘会洲 Triton X-100 与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 分析化学, 2000, 23(6): 699.
- [5] 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓等编著. 荧光分析法[M]. (第 2 版), 北京: 科学出版社, 1990 122
- [6] 张保林, 王文清, 袁荣尧等 葱醌及黄酮类化合物与牛血清白蛋白结合的反应研究[J]. 化学学报, 1994, 52(12): 1213
- [7] 易平贵, 俞庆森, 商志才等 氧氟沙星与牛血清白蛋白相互作用机制[J]. 药理学, 2000, 35(10): 774
- [8] 何华, 于俊生, 徐珊珊等 环丙沙星与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 药理学, 2001, 36(7): 549.

Study on the Interaction between Levofloxacin and Human Serum Albumin by Fluorescence and Determination

CHEN Yu-Hai ZHANG Yan-Qing^a ZHAO Feng-Li^a LU Bao-Sheng^a

(Baoqing Vocational and Technical College, Baoqing, Hebei 071051, P. R. China)

^a(Center of Physics and Chemistry, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, P. R. China)

Abstract The interaction of antibiotic drug: levofloxacin with human serum albumin (HSA) was studied by fluorescence spectroscopy and ultra-violet spectroscopy. the quenching interaction equilibrium constant K was calculated at different temperature, which is decreased with the temperature. Depending on the thermodynamic parameters, the main interaction between levofloxacin and HSA is dispersion force. Based on the mechanism of the Foerster energy transference, the transfer efficiency of energy and distance between the acceptor levofloxacin and HSA were found. The course of action is single static quenching and the mechanism of quenching was based on energy transfer. The good linear relationship between the degree of BSA quenching and the concentration of lomefloxacin. The range of the system at 25 °C is $2.0 \times 10^{-6} \sim 2.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The detection limit is $1.2 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. This method has been applied to the determination of lomefloxacin in pieces, the relative standard deviation is 1.5%—2.1%, the recovery is 94.8%—97.7%.

Key words Fluorescence Quenching, Levofloxacin, Human Serum Albumin, Mechanism.

这真是令人啼笑皆非——重大发明创造被视为“旧货”!

欢迎作者将被退稿佳作, 再投本刊

在 20 世纪的科技成就中, 激光可算是重大发明创造之一。第一台激光器是 1960 年由美国物理学家梅曼(见《邮票上的科学家——佼佼者之路》中之 M4) 研制出来的。然而《物理评论快报》却拒绝刊登梅曼的论文, 理由是: 这是微波激光物理学方面的文章, 对快速出版物不再有价值。这真是令人啼笑皆非!

接着, 梅曼将论文寄到了英国《自然》杂志, 这篇 300 字的简短文章立即被接受。发表后引起全世界轰动。后来, 梅曼被列入了美国发明家名人堂。

为了吸取历史教训, 本刊收到的论文, 即使其观点与审稿人有尖锐的意见冲突, 只要是言之有理, 也给予发表。因为“仁者见之谓之仁, 智者见之谓之智”(《周易·系辞上》), 不同人从不同角度看问题, 难免不同。我们欢迎作者将被退稿佳作, 再投本刊。

《光谱实验室》编辑部