

# 普利沙星与牛血清白蛋白相互作用的光谱学研究

陈昌云<sup>1,2</sup>, 李小华<sup>2</sup>, 许飞<sup>2</sup>, 相秉仁<sup>1</sup>

(1. 中国药科大学分析测试中心, 江苏 南京 210009)

(2. 南京晓庄学院化学系, 江苏 南京 210017)

**[摘要]** 采用荧光光谱法(FS)和紫外光谱法(UV)研究了普利沙星与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用. 确定了静态猝灭和非辐射能量转移是普利沙星猝灭 BSA 荧光的主要原因; 求得了普利沙星与 BSA 之间的结合常数  $K$  在 25℃ 时为  $1.05 \times 10^5$ 、在 37℃ 时为  $6.68 \times 10^4$ ; 它们之间的结合位点数  $n$  为 1; 根据 Förster 非辐射能量转移机理求得给体与受体间的结合距离  $r$  为 5.59 nm 和能量转移效率  $E=0.163$ . 牛血清白蛋白与普利沙星分子间有较强的结合作用, 且结合力以静电作用为主.

**[关键词]** 普利沙星, 牛血清白蛋白, 荧光法, 分光光度法

**[中图分类号]** O641.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)01-0062-04

## Spectroscopic Studies on the Interaction between PL and BSA

Chen Changyun<sup>1,2</sup>, Li Xiaohua<sup>2</sup>, Xu Fei<sup>2</sup>, Xiang Bingren<sup>1</sup>

(1. Analysis Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

(2. Department of Chemistry, Nanjing Xiaozhuang College, Nanjing 210017, China)

**Abstract:** Study the interaction between prulifloxacin and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy and ultraviolet spectroscopy. The static quenching and the non-radiation energy transfer are the two main reasons leading to the fluorescence quenching of BSA. The apparent combining constants ( $K$ ) between prulifloxacin and BSA are  $1.05 \times 10^5$  at 25℃ and  $6.68 \times 10^4$  at 37℃, and the binding sites are 1. The binding distance ( $r=5.59$  nm) and energy transfer efficiency ( $E=0.163$ ) are obtained by Förster's non-radiation energy transfer mechanism. The interaction between prulifloxacin and BSA is driven mainly by eletro-static force.

**Key words:** Prulifloxacin, bovine serum albumin, fluorescence, spectrophotometry

## 0 引言

普利沙星(Prulifloxacin)是由日本新药公司和明治公司共同研制开发的新一代氟喹诺酮类抗菌药<sup>[1]</sup>. 血清白蛋白是血浆中含量最为丰富的蛋白质,它不仅对维持渗透压起重要作用,而且它能与进入血液的多数内源性和外源性物质(如药物等)进行可逆的结合从而起到在体内转运作用. 药物与白蛋白的亲合力大小也影响到药物在体内的分布、清除以及通过改变血液或组织中游离药物浓度来影响药效<sup>[2]</sup>. 因此,研究药物与血清白蛋白的相互作用对理解药物的作用机理以及筛选药效更高的新药具有重要意义.

本文采用吸收光谱和荧光光谱研究了普利沙星(PL)与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用,求得它们的结合常数和热力学参数,探讨了在人体生理 pH 值条件下 PL 与 BSA 的相互作用机理以及普利沙星对 BSA 构象的影响.

收稿日期: 2005-04-18.

基金项目: 江苏省教育厅自然科学基金资助项目(02KJD150015), 南京晓庄学院自然科学基金资助项目(2005NXY10).

作者简介: 陈昌云, 1973—, 博士研究生, 讲师, 主要从事药物分析的研究. E-mail: yhjiaangccy@126.com

通讯联系人: 相秉仁, 1942—, 教授, 博士生导师, 主要从事计算药物分析的研究. E-mail: xiangbr@cpu.edu.cn

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

TU1901 型双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用);LS-50B 型荧光光谱仪(Perkin-Elmer 公司),配有 CS501 型超级恒温器;pHS-25 型数显酸度计(雷磁)。

普利沙星由中国药科大学提供。PL 储备液浓度为  $4.0 \times 10^{-4}$  mol/L;牛血清白蛋白(BSA);0.05 mol/L 的 pH=7.4 的 Tris-HCl 缓冲液(以 0.9% 的 NaCl 水溶液配制);所有试剂均为分析纯;实验用水均为二次蒸馏水。

### 1.2 实验方法

吸收光谱和荧光光谱测量都是在 10 mL 容量瓶中加入一定量的 BSA 溶液,Tris-HCl 缓冲液,以二次水稀释至刻度,混匀。准确移取 3.00 mL 的样品溶液于 1 cm 石英比色皿中,逐渐将微升量的 PL 溶液滴加到 BSA 试液中,分别记录加入 PL 前后体系的荧光光谱。进行吸收光谱测量时,分别测量 BSA、PL 和 BSA—PL 体系的吸光度。荧光光谱测量中,以 279 nm 为激发波长,激发和发射狭缝均为 3.0 nm,发射单色器的扫描速度为 500 nm/min。同步荧光光谱实验中同时扫描激发和发射单色器,固定激发和发射波长差为 60 nm,其它同荧光光谱测量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 吸收光谱

由 BSA、PL 及 PL—BSA(1:1)复合体系的紫外吸收光谱(图 1)可以看出,PL—BSA 复合体系的吸收光谱与单独 PL、BSA 的吸收光谱的加和相比,发生了明显的减色效应,吸收光谱的变化表明 PL 和 BSA 的基态发生反应,表明它对 BSA 的猝灭过程为静态猝灭。

### 2.2 荧光光谱的研究

#### 2.2.1 荧光发射光谱

图 2 是在 37℃, pH 值为 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液体系中,改变 PL 浓度记录 BSA 的荧光发射光谱,可以看出随着  $0 \sim 1.4 \times 10^{-6}$  mol/L 的 PL 的加入,BSA 在 348 nm 处的荧光强度逐渐降低,同时在 382 nm 处出现一个等光密度点,表明 PL 与 BSA 之间发生了相互作用从而猝灭了 BSA 的荧光。由图还可以观察到随着 PL 的浓度的不断增加,BSA 的荧光强度的猝灭趋势有所减缓,即 PL 与 BSA 的键合作用逐渐趋于饱和。

根据 Stern-Volmer<sup>[3]</sup> 方程:

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

其中, $F_0$  为 PL 不存在时的 BSA 的荧光强度, $F$  为加入 PL 后体系的荧光强度, $K_q$  为双分子猝灭过程的速率常数, $\tau_0$  为没有猝灭剂存在下的荧光分子的平均寿命, $K_{SV}$  为 Stern-Volmer 猝灭常数。 $[Q]$  为猝灭剂 PL 的浓度。以  $F_0/F$  为纵坐标,PL 的浓度为横坐标作图可得 PL 对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线。

从图 3 中可以看出曲线呈良好的线性关系,25℃ 时的相关系数  $R$  为 0.996 0,由其斜率求得 PL 猝灭 BSA 的猝灭常数为  $5.74 \times 10^4$  L/mol。大分子的  $\tau_0$  一般为  $10^{-8}$  s,则可根据  $K_{SV} = K_q\tau_0$  式,进一步求出  $K_q$  为  $5.74 \times 10^{12}$  L/(mol ·

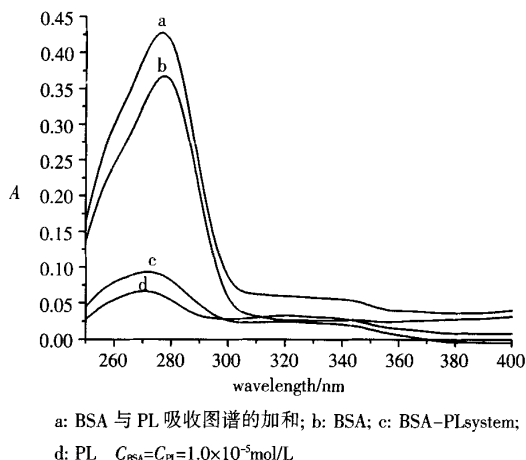


图 1 BSA 与普利沙星的紫外吸收光谱

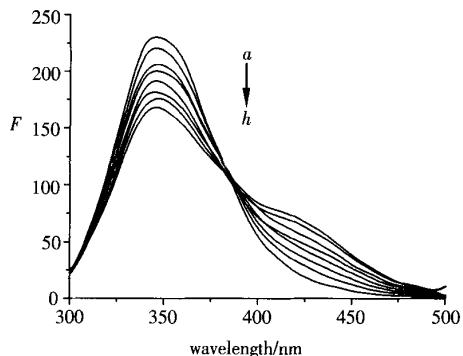


图 2 普利沙星对 BSA 荧光光谱的影响

s), 一般认为各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数为  $2 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ , 显然 PL 对 BSA 荧光猝灭速率远远大于扩散控制的  $K_q$ , 从这一点看, PL 对 BSA 荧光猝灭不应是动态猝灭, 而可能是静态猝灭, 这个结果与紫外光谱法得到的结论一致. 静态猝灭是猝灭剂与荧光物质分子在基态时生成不发光的配合物, 从而导致荧光物质荧光强度的降低.

## 2.2.2 温度与荧光猝灭的关系

当温度分别为  $15^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$  和  $37^\circ\text{C}$  时, 分别在浓度一定的 BSA 溶液中加入不同浓度的 PL, 得到不同温度下 PL 猝灭蛋白质荧光的猝灭曲线(图 3). 由图 3 中可以看出, 各曲线均有良好的线性关系, 由直线的斜率求得温度在  $15^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$  和  $37^\circ\text{C}$  下的  $K_{SV}$  值分别为  $1.7 \times 10^5$ ,  $5.74 \times 10^4$  和  $2.98 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}$ . 随着温度的增加, 猝灭常数( $K_{SV}$ )逐渐降低, 进一步表明了 PL 对 BSA 荧光的猝灭过程为静态猝灭, 即化合物 PL 与 BSA 形成了一个没有荧光的复合物, 该复合物随着温度的增加, 其稳定性下降, 从而导致了猝灭常数的降低.

## 2.2.3 同步荧光光谱

同步荧光光谱经常用来研究药物分子对蛋白质的构象的影响. 蛋白质的荧光是由构成蛋白质的色氨酸、酪氨酸及苯丙氨酸产生的荧光所共同形成的<sup>[4]</sup>. 当同步扫描波长差  $\Delta\lambda$  为  $60 \text{ nm}$  时, BSA 的同步荧光主要是色氨酸残基发射的荧光. 而色氨酸的最大荧光发射波长与其所处的介质环境有关. 图 4 是 BSA 溶液中逐渐增加 PL 的浓度所记录的同步荧光光谱. 在图 4 中, 随着 PL 的浓度从 0 增加到  $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ , 体系的同步荧光强度被强烈猝灭即 PL 在  $278 \text{ nm}$  处的发射峰减低且其最大发射波长红移了  $6.4 \text{ nm}$ , 说明色氨酸残基所处环境的疏水性降低, BSA 内部的疏水结构有所瓦解, 肽链的伸展程度增加<sup>[4]</sup>.

## 2.3 结合位点数与结合常数的求算

药物分子与蛋白质分子之间的相互作用一般采用位点结合模型来描述, 依据 Scatchard 方程<sup>[5]</sup>, 可求得结合反应的结合常数和结合位点数. 确定猝灭机理后, 将所得的各荧光光谱, 按  $348 \text{ nm}$  处的相对荧光强度以  $F_0/F$  对  $C_{SH}F_0[Q_i]/(F_0 - F)$  作线性拟合, 得到不同温度下, PL 与 BSA 形成复合物的结合常数和结合位点数(表 1), 结果表明, PL 与 BSA 作用时只有一个结合位点, 并且随温度的升高, 结合常数减小.

## 2.4 普利沙星 BSA 间的结合距离

按照 Forster 能量转移理论, 可以求得药物与蛋白质结合时结合位置与蛋白质分子中荧光发射基团之间的距离  $r^{[5]}$ :

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (1)$$

式中  $E$  是授体与受体间能量转移效率,  $R_0$  是转移效率为 50% 时的临界距离<sup>[5]</sup>:

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 n^{-4} \Phi J \quad (2)$$

式中  $K^2$  为偶极空间取向因子,  $n$  为介质的折射指数,  $\Phi$  为授体的荧光量子产率,  $J$  为授体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱间的重叠积分, 可表示为<sup>[5]</sup>:

$$J = [\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \lambda] / [\sum F(\lambda) \lambda] \quad (3)$$

其中  $F(\lambda)$  为荧光授体在波长  $\lambda$  处的荧光强度,  $\varepsilon(\lambda)$  为受体在波长  $\lambda$  处的摩尔消光系数, 能量转移效率  $E$

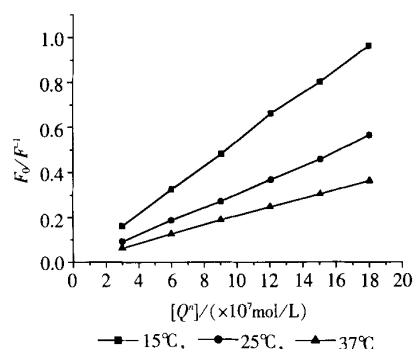


图 3 PL 对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线

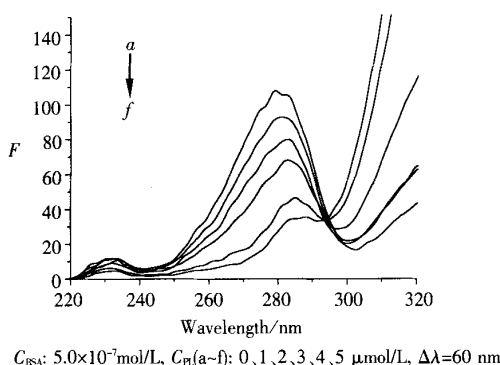


图 4 BSA 的同步荧光光谱

表 1 PL 与 BSA 相互作用的结合常数

温度/ $^\circ\text{C}$	$K/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$n$
15	$6.29 \times 10^5$	1.03
25	$1.05 \times 10^5$	1.01
37	$6.68 \times 10^4$	0.98

则可由下式求出<sup>[5]</sup>:

$$E = 1 - F/F_0 \quad (4)$$

图5为普利沙星的吸收光谱和BSA的荧光发射谱的重叠图,将图5中的光谱重叠部分分割成极小的矩形,按式(3)积分,得到 $J = 4.18 \times 10^{-25} \text{ cm}^3/(\text{L} \cdot \text{mol})$ . 在实验条件下,取向因子取授体-受体各向随机分布的平均值 $K^2 = 2/3$ <sup>[6]</sup>,折射指数取水和有机物的平均值 $n = 1.45$ <sup>[6]</sup>,BSA中色氨酸残基量子效率 $\Phi = 0.10$ <sup>[6]</sup>. 将上述各量代入式(2),求得 $R_0 = 4.26 \text{ nm}$ ,结合荧光结果及式(4)算得能量转移效率 $E = 0.163$ . 进而由 $R_0$ 经式(1)算出 $r = 5.59 \text{ nm}$ .

在实验条件下( $\lambda_{\text{ex}} = 279 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 348 \text{ nm}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ), BSA的荧光主要来自第212位的色氨酸残基<sup>[7]</sup>,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. PL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 $r$ 值较大.

## 2.5 药物与白蛋白作用力类型的确定

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,由式:

$$\ln K_2/K_1 = \Delta H(1/T_1 - 1/T_2)/R \quad (5)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K \quad (6)$$

可求得 $\Delta H$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta S$ . PL与BSA的结合的 $\Delta H$ ,  $\Delta S$ 在 $25^\circ\text{C}$ 分别为: $\Delta H = -41.957 \text{ kJ}$ ,  $\Delta S = 226.448 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$ . 当反应的焓变 $\Delta H > 0$ ,熵变 $\Delta S > 0$ 时,分子之间的相互作用力来自于静电作用和疏水作用力;反应的焓变 $\Delta H < 0$ ,熵变 $\Delta S < 0$ 时,分子的作用力可能来自于范德华力、氢键或质子化等作用力; $\Delta H = 0$ ,  $\Delta S > 0$ ,疏水作用力; $\Delta H < 0$ ,  $\Delta S > 0$ ,静电引力<sup>[8]</sup>;所以认为普利沙星与BSA之间的作用力主要为静电引力.

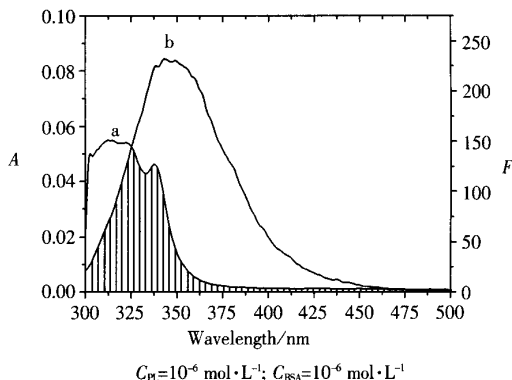


图5 PL的吸收光谱(a)和BSA的荧光光谱(b)的重叠图

## [参考文献]

- [1] 夏建民. 抗菌新药普利沙星[J]. 上海医药, 1999, 11(1):24—25.
- [2] Ulrich K H. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin[J]. Pharmacol Rev, 1981, 33:17—53.
- [3] 陈国珍. 荧光分析法[M]. 北京: 科学出版社, 1990:122—123.
- [4] 张晓威, 赵凤林, 李克安. 环丙沙星与牛血清白蛋白相互作用的研究[J]. 高等学校化学学报, 1999, 20(7): 1063—1067.
- [5] 肖厚荣, 盛良全, 施春华, 等. 水杨酸与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(1): 78—81.
- [6] 马贵斌, 杨频. 荧光法研究维生素B<sub>6</sub>和芦丁与白蛋白的相互作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17(4): 290—294.
- [7] 马贵斌, 高飞, 任斌知, 等. 荧光法研究药物分子与人血清白蛋白的结合作用[J]. 化学学报, 1995, 53(8): 1193—1197.
- [8] Ross P D. Subramanian. Thermodynamics of protein association reaction; forces contribution to stability[J]. Biochemistry, 1981, 20: 3096—3102.

[责任编辑:孙德泉]