

• 研究论文 •

## 几种抗生素与人血清白蛋白结合反应的研究

毕淑云<sup>a,b</sup> 丁 兰<sup>a</sup> 宋大千<sup>a</sup> 田 媛<sup>a</sup> 张寒琦<sup>\*,a</sup>

(<sup>a</sup> 吉林大学化学学院 长春 130012)

(<sup>b</sup> 延边大学理工学院化学系 延吉 133002)

**摘要** 用荧光法研究了头孢噻肟钠、苯唑西林、阿莫西林、诺氟沙星、依诺沙星等五种抗生素类药物与人血清白蛋白的结合反应, 测得 26 °C 时的结合常数  $K_A$  分别为  $1.98 \times 10^4$ ,  $1.01 \times 10^3$ ,  $1.38 \times 10^3$ ,  $5.97 \times 10^4$  和  $7.15 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 结合位点数  $n$  分别为 1.16, 0.86, 1.19, 0.91 和 0.93. 确定了这些药物与人血清白蛋白之间的主要结合力为静电作用力.

**关键词** 人血清白蛋白; 头孢噻肟钠; 苯唑西林; 阿莫西林; 诺氟沙星; 依诺沙星; 荧光光谱法

## Studies on the Binding Mechanism of Several Antibiotics and Human Serum Albumin

BI, Shu-Yun<sup>a,b</sup> DING, Lan<sup>a</sup> SONG, Da-Qian<sup>a</sup> TIAN, Yuan<sup>a</sup> ZHANG, Han-Qi<sup>\*,a</sup>

(<sup>a</sup> College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130012)

(<sup>b</sup> Chemistry Department, College of Science and Engineering, Yanbian University, Yanji 133002)

**Abstract** The binding characteristics of antibiotics, cefotaxime sodium, oxacillin, amoxicillin, norfloxacin and enoxacin with human serum albumin (HSA) were studied by fluorescence spectrometry. These drugs quenched the HSA fluorescence via a nonradiative energy transfer mechanism. The binding constants ( $K_A$ ) and binding sites ( $n$ ) for drug-HSA were obtained by an improved analysis method to process the experimental data. The values of  $K_A$  obtained were  $1.98 \times 10^4$ ,  $1.01 \times 10^3$ ,  $1.38 \times 10^3$ ,  $5.97 \times 10^4$  and  $7.15 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  for cefotaxime sodium-HSA, oxacillin-HSA, amoxicillin-HSA, norfloxacin-HSA and enoxacin-HSA, respectively, at 26 °C. The values of  $n$  were 1.16, 0.86, 1.19, 0.91 and 0.93, respectively, for these drugs in the above order. The electrostatic interaction was found to be main acting force in the studied systems.

**Keywords** human serum albumin; cefotaxime sodium; oxacillin; amoxicillin; norfloxacin; enoxacin; fluorescence quenching

人血清白蛋白(HSA)是人血浆中最丰富的蛋白质, 它作为许多内源性和外源性化合物的存储和转运蛋白, 可与许多化合物分子发生相互作用<sup>[1]</sup>. 药物与蛋白质结合是药物的暂储形式, 是控制药物向受体释放、避免药物迅速代谢的主要途径. 近年来, 对药物与白蛋白相互作用方面的研究十分活跃<sup>[2~5]</sup>, 将有助于了解药物在人体内的吸收、分布、排泄、药理活性和毒性<sup>[6]</sup>.

头孢噻肟钠(cefotaxime sodium)是一种头孢类  $\beta$ -内酰胺类抗生素, 苯唑西林(oxacillin)、阿莫西林(amoxicillin)是属于  $\beta$ -内酰胺类半合成青霉素类抗生素, 诺氟沙星(norfloxacin)与依诺沙星(enoxacin)是氟喹诺酮类合成抗菌药. 所研究的药物均具有广谱抗菌性, 其结构式见图 1. 本文用荧光光谱法研究了人体生理 pH 值条件下这些药物与 HSA 的结合反应, 测定了结合常数、

\* E-mail: analchem@mail.jlu.edu.cn

Received February 18, 2005; revised May 8, 2005; accepted August 23, 2005.

吉林省科技发展计划项目(No. 20040561)及高等学校博士学科点科研基金(No. 2003183035)资助课题.

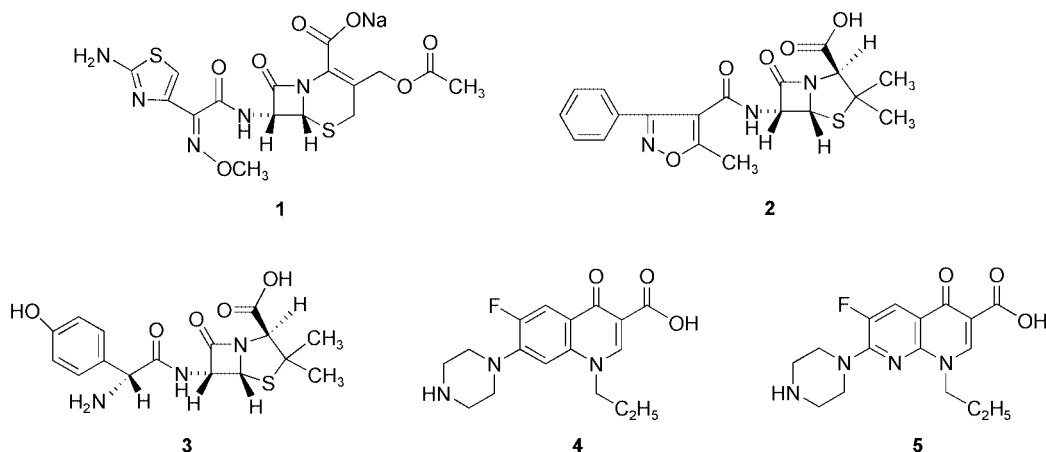


图1 头孢噻肟钠(1)、苯唑西林(2)、阿莫西林(3)、诺氟沙星(4)和依诺沙星(5)的分子结构

Figure 1 Molecular structures of cefotaxime sodium (1), oxacillin (2), amoxicillin (3), norfloxacin (4) and enoxacin (5)

结合位点数与结合力类型. 本文的数据处理方法克服了以往文献所报导方法<sup>[7-10]</sup>的局限性, 并已经用于中药有效成分蒽醌类化合物与血清白蛋白结合参数的计算<sup>[11]</sup>, 本文则对几种西药抗生素与人血清白蛋白进行了研究.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

RF-5301PC 荧光光度计(日本岛津公司); GBC Cintra 10e UV-vis 紫外分光光度计(澳大利亚); pHS-3C 数字酸度计(杭州东兴仪器设备厂); 电子恒温水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司).

HSA (上海生物制品研究所, 纯度>95%)的  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的储备液, 头孢噻肟钠、苯唑西林、阿莫西林、诺氟沙星、依诺沙星 (中国药品生物制品鉴定所) 的  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  水溶液;  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH=7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液含有  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaCl; 所用其它试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水.

### 1.2 实验方法

将一定量的 HSA 与药物溶液依次加入到 10 mL 的容量瓶中, 以 pH=7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液稀释至刻度, 混匀, 于恒温水浴中恒温 5 min. 移取该溶液 2.5 mL 于带有磨口塞的荧光池中, 设定激发波长为 280 nm, 扫描范围为 290~500 nm, 激发与发射狭缝宽均为 5 nm, 测定荧光发射光谱.

## 2 结果与讨论

### 2.1 荧光特性

对于 HSA 溶液, 当激发波长为 280 nm 时, 在 340 nm 处有一最大发射峰. 配置一系列含有不同浓度药物、

而 HSA 总浓度始终为  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的待测溶液, 扫描得到的结果见图 2. 由图 2 可见, 随着溶液中药物浓度的增大, HSA 在 340 nm 处的荧光强度呈现有规律的降低, 峰形不变, 峰位略有改变. 对于诺氟沙星与依诺沙星, 激发波长为 280 nm 时, 二者分别在约 430 及 370 nm 处有荧光发射峰, 当不断增加药物浓度时, 发射峰强度不断增加. 但与 HSA 无关, 说明 HSA 不会使诺氟沙星与依诺沙星的荧光发生敏化. 280 nm 激发时, 蛋白质分子中色氨酸(Trp-214)残基和酪氨酸(Tyr)残基的最大荧光强度的波长分别位于 340 和 300 nm 左右. 本研究中观察到, 340 nm 处有较强的荧光, 它产生于 Trp-214 残基. 而且随着所研究的药物浓度的增加, 340 nm 附近荧光强度不断地降低, 表明这些药物与 HSA 结合时接近于白蛋白 Trp-214 残基.

外加分子引起 HSA 荧光猝灭的原因有动态猝灭和静态猝灭之分. 动态猝灭通常符合 Stern-Volmer 方程<sup>[12]</sup>:  $F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q]$ , 其中,  $F$  和  $F_0$  分别为猝灭剂浓度为  $[Q]$  和猝灭剂不存在时荧光体的荧光强度,  $\tau_0$  为无猝灭剂时荧光体的荧光寿命, 对生物大分子,  $\tau_0 = 10^{-8} \text{ s}$ <sup>[13]</sup>,  $K_q$  是双分子猝灭过程速率常数,  $K_{sv}$  是 Stern-Volmer 动态猝灭常数. 假设这五种药物对 HSA 猝灭均为动态猝灭过程, 按照 Stern-Volmer 方程, 以  $F_0/F$  对  $[Q]$  作一元线性回归, 由直线斜率可得到头孢噻肟钠、苯唑西林、阿莫西林、诺氟沙星、依诺沙星等药物的猝灭速率常数  $K_q$  分别为  $1.94 \times 10^{12}$ ,  $9.74 \times 10^{10}$ ,  $1.50 \times 10^{11}$ ,  $4.61 \times 10^{12}$ ,  $5.38 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ . 由于各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散控制的碰撞猝灭速率常数为  $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ <sup>[14]</sup>, 显然所研究的这些药物对 HSA 荧光猝灭速率常数  $K_q$  远大于这一数据. 表明动态碰撞猝灭不是引起 HSA 荧光猝灭的主要原因,

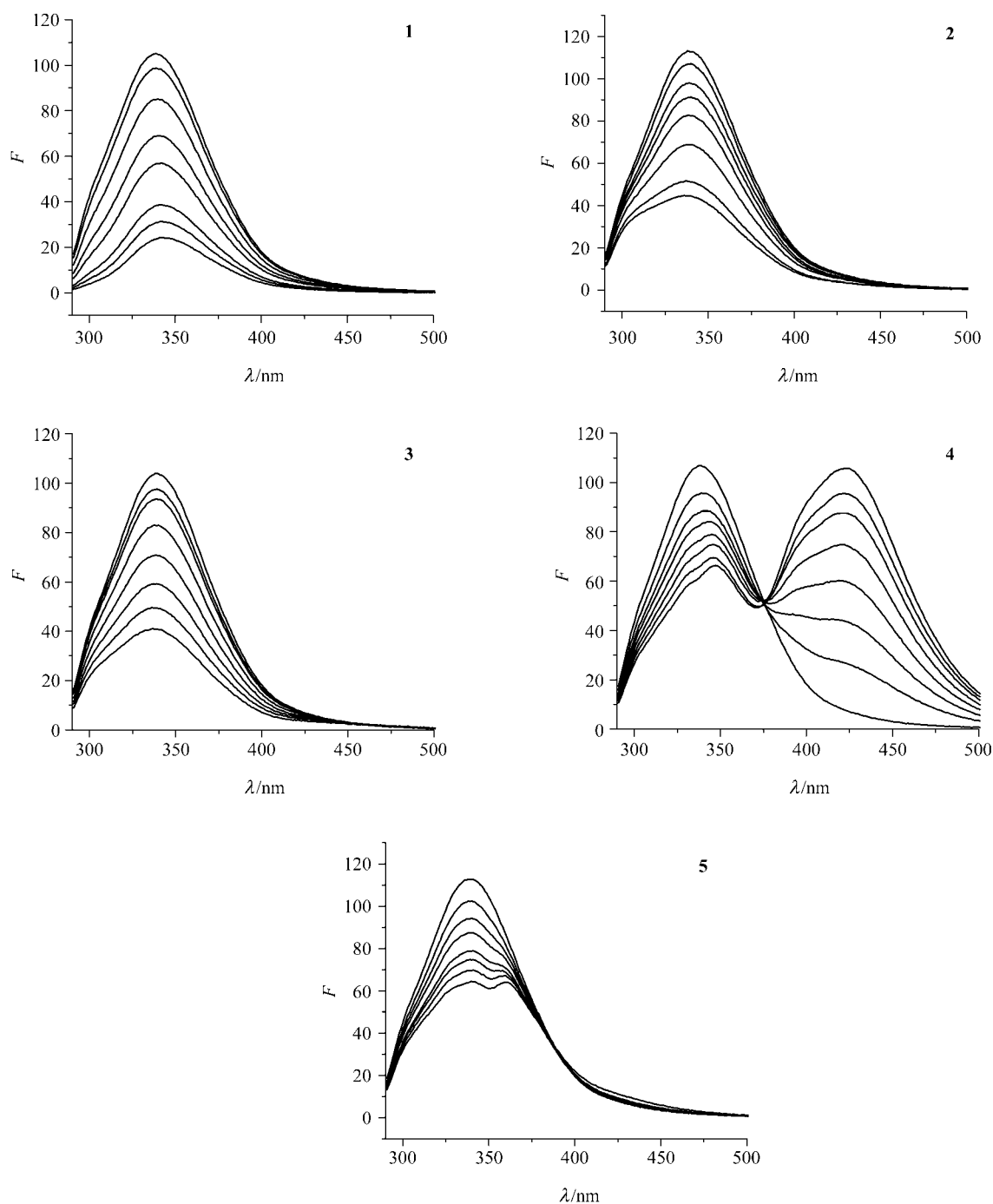


图2 头孢噻肟钠(1)、苯唑西林(2)、阿莫西林(3)、诺氟沙星(4)和依诺沙星(5)对 HSA 的荧光猝灭作用

**Figure 2** Effects of cefotaxime sodium (1), oxacillin (2), amoxicillin (3), norfloxacin (4) and enoxacin (5) on the fluorescence spectra of human serum albumin (HSA)

$c_{\text{cefotaxime sodium}}$  from top to bottom: 0, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00, 12.00 and 14.00 ( $\times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ );  $c_{\text{oxacillin}}$  from top to bottom: 0, 0.15, 0.74, 1.47, 2.94, 5.89, 11.78 and 14.71 ( $\times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ );  $c_{\text{amoxicillin}}$  from top to bottom: 0, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00 and 10.00 ( $\times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ );  $c_{\text{norfloxacin}}$  from top to bottom: 0.00, 2.04, 4.08, 6.12, 8.16, 10.20, 12.24 and 14.28 ( $\times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ );  $c_{\text{enoxacin}}$  from top to bottom: 0.00, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00, 12.00 and 14.00 ( $\times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ );  $c_{\text{HSA}}=1.0\times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

而是药物与 HSA 分子间形成复合物所引起的静态猝灭。为了进一步证明此推断, 在 26, 37 °C 下分别测定了药物与 HSA 的结合性质, 并得到了 26 °C 时头孢噻肟钠、苯唑西林、阿莫西林、诺氟沙星、依诺沙星等药物与 HSA 的结合常数  $K_A$  (见表 1) 以及 37 °C 下的  $K_A$  为:

$1.75\times 10^4$ ,  $8.44\times 10^2$ ,  $1.30\times 10^3$ ,  $5.01\times 10^4$  和  $6.20\times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。比较两个温度下的结合常数发现,  $K_A$  随着温度的升高而减小, 说明这五种抗生素对 HSA 的荧光猝灭是静态猝灭过程。

表 1 药物与人血清白蛋白的结合常数及结合位点数  
Table 1 Binding constants and binding sites of the drugs and HSA (26 °C)

Drug	Method 1		Method 2		Method 3
	$K_A/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	$n$	$K_A/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	$n$	$K_A/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$
Cefotaxime sodium	$1.98 \times 10^4$	1.16	$1.38 \times 10^5$	1.21	$1.54 \times 10^4$
Oxacillin	$1.01 \times 10^3$	0.86	$2.07 \times 10^2$	0.71	$1.85 \times 10^3$
Amoxicillin	$1.38 \times 10^3$	1.19	$5.36 \times 10^3$	1.19	$1.14 \times 10^3$
Norfloxacin	$5.97 \times 10^4$	0.91	$4.62 \times 10^4$	1.00	$4.47 \times 10^4$
Enoxacin	$7.15 \times 10^4$	0.93	$7.55 \times 10^4$	1.03	$5.21 \times 10^4$

## 2.2 药物与 HSA 的结合常数 $K_A$ 和结合位点数 $n$

处理荧光猝灭数据的公式有很多, 其中 Scatchard 作图法<sup>[7]</sup>是研究生物大分子与有机小分子结合的经典方法, 但应用时必须知道游离态药物的浓度, 而这一点在用荧光法时不易做到. 对于文献报道的其它公式<sup>[8-10]</sup>, 也有一些局限. 为此, 我们提出了改进的公式<sup>[11]</sup>:  $\log \frac{F_0-F}{F} = n \log K_A + n \log ([D_t] - n[P_t] \frac{F_0-F}{F_0})$  (方法 1), 式中  $[D_t]$  和  $[P_t]$  分别为溶液中药物和蛋白质的总浓度. 根据这一公式, 对所测得的实验数据进行处理, 得到  $\log \frac{F_0-F}{F}$  对  $\log ([D_t] + m \frac{F_0-F}{F_0})$  的曲线, 其中  $m = -n[P_t]$ , 根据此曲线的斜率和截距求出  $K_A$  和  $n$ . 文献中常用  $\log \frac{F_0-F}{F} = \log K_A + n \log [D_f]$ <sup>[18]</sup> (方法 2) 以及  $\frac{1}{F_0-F} = \frac{1}{F_0} + \frac{1}{K_A F_0 [D_f]}$ <sup>[9]</sup> (方法 3) 来求  $K_A$  和  $n$ , 这

二种方法所用公式中  $[D_f]$  都是药物的游离浓度, 但实验中由于  $[D_f]$  很难知道, 故往往用已知的药物总浓度  $[D_t]$  来代替, 这就带来了一定的误差, 尤其是对于与白蛋白结合能力较强的药物的研究, 结果将与实际情况相差较大. 而改进的公式中则都利用了已知的药物与蛋白的总浓度作图, 更加合理并接近于实际. 图 3、图 4 和图 5 分别为三种方法处理得到的关系曲线.

由图 3、图 4 和图 5 计算得到的结合常数及结合位点数列于表 1 中. 从表 1 可以看出, 本文方法 1 求得的  $K_A$  与方法 2 求得的  $K_A$  对于头孢噻肟钠、苯唑西林、阿莫西林等三种药物符合得不好, 但是与方法 3 求得的  $K_A$  基本吻合. 但方法 3 不适用于多结合位点的情况.

## 2.3 药物与 HSA 结合反应的作用力的确定

在四个不同温度下分别测定了头孢噻肟钠、苯唑西林、阿莫西林、诺氟沙星、依诺沙星与 HSA 的结合常数, 根据文献<sup>[4,5]</sup>中热力学关系  $\ln K_{A1}/K_{A2} = (1/T_1 - 1/T_2)$  及  $\Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T\Delta S$  可求得  $\Delta H$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta S$ . 分别根据 18 °C 与 26 °C, 26 °C 与 37 °C, 37 °C 与 47 °C 时获得的结合常数经计算可分别得到  $\Delta H_1$ ,  $\Delta H_2$ ,  $\Delta H_3$ ,  $\Delta G_1$ ,  $\Delta G_2$ ,  $\Delta G_3$  和  $\Delta S_1$ ,  $\Delta S_2$ ,  $\Delta S_3$ , 结果列于表 2. 发现对于所

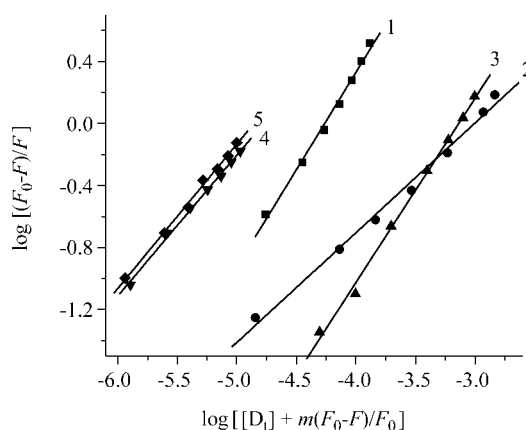


图 3  $\log[(F_0-F)/F]$  与  $\log[[D_t] + m(F_0-F)/F_0]$  的关系曲线  
Figure 3 Plots of  $\log[(F_0-F)/F]$  vs.  $\log[[D_t] + m(F_0-F)/F_0]$  for (1) cefotaxime sodium, (2) oxacillin, (3) amoxicillin, (4) norfloxacin and (5) enoxacin at 26 °C

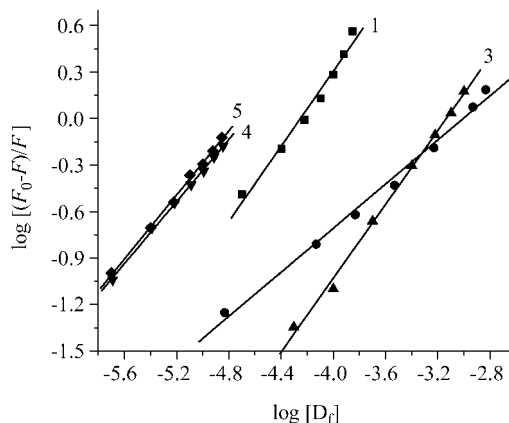


图 4  $\log[(F_0-F)/F]$  与  $\log[D_t]$  的关系曲线  
Figure 4 Plots of  $\log[(F_0-F)/F]$  vs.  $\log[D_t]$  for (1) cefotaxime sodium, (2) oxacillin, (3) amoxicillin, (4) norfloxacin and (5) enoxacin at 26 °C

研究的反应,  $\Delta H$  均为负值而  $\Delta S$  均为正值, 根据文献<sup>[15]</sup>中对作用力类型与热力学函数之间的关系阐述, 认为头孢噻肟钠、苯唑西林、阿莫西林、诺氟沙星、依诺沙星与 HSA 之间的作用力主要为静电引力.

表2 药物-HSA 结合反应的热力学参数

Table 2 Thermodynamic parameters of drug-HSA binding reaction

Drug	$\Delta H_1/$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_2/$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_3/$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_1/$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_2/$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_3/$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_1/$ (J·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_2/$ (J·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_3/$ (J·mol <sup>-1</sup> )
Cefotaxime sodium	-7.46	-8.78	-9.49	-24.15	-24.61	-25.19	57.33	52.95	50.64
Oxacillin	-11.75	-12.73	-10.86	-17.06	-17.21	-17.37	18.24	14.98	21.02
Amoxicillin	-19.46	-4.19	-6.37	-23.13	-23.71	-24.43	72.75	65.25	76.70
Norfloxacin	-13.58	-12.29	-14.67	-27.90	-27.80	-27.01	46.18	50.33	42.41
Enoxacin	-12.51	-10.00	-13.42	-27.39	-27.80	-28.45	51.10	59.51	48.49

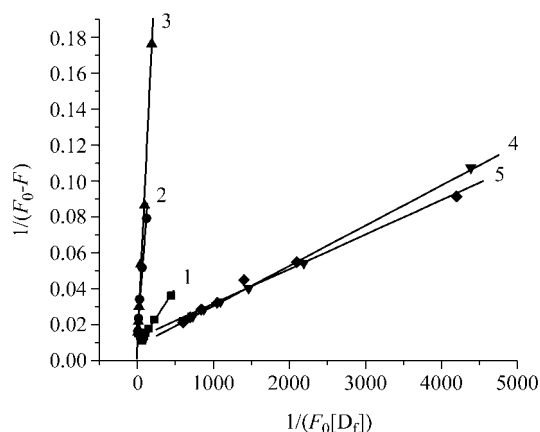
图5  $1/(F_0-F)$ 与 $1/(F_0[D_f])$ 的关系曲线

Figure 5 Plots of  $1/(F_0-F)$  vs.  $1/(F_0[D_f])$  for (1) cefotaxime sodium, (2) oxacillin, (3) amoxicillin, (4) norfloxacin and (5) enoxacin at 26 °C

## References

- Kragh, H. U. *Pharmacol. Rev.* **1981**, 33, 17.
- Dilson, S.; Célia, M. C.; Sônia, R. W. L. *Spectrochim. Acta, Part A* **2004**, 60, 1215.
- Lilianna, T.-L.; Aldona, K.; Bernhard, K. K.; Henryk, K. J. *Inorg. Biochem.* **2000**, 78, 341.
- Bi, S.-Y.; Ding, L.; Tian, Y.; Song, D.-Q.; Zhou, X.; Liu, X.; Zhang, H.-Q. *J. Mol. Struct.* **2004**, 703, 37.
- Bi, S.-Y.; Song, D.-Q.; Tian, Y.; Zhou, X.; Liu, Z.-Y.; Zhang, H.-Q. *Spectrochim. Acta, Part A* **2005**, 61, 629.
- Iwatsubo, T.; Hirota, N.; Ooie, T.; Uzuki, H.; Sugiyama, Y. *Biopharm. Drug Dispos.* **1996**, 17(4), 273.
- Scatchard, G.; Ann, N. Y. *Acad. Sci.* **1949**, 51, 660.
- Alain, M.; Michel, B.; Michel, A. J. *Chem. Educ.* **1986**, 63(4), 365.
- Jiang, C.-Q.; Gao, M.-X.; Meng, X.-Z. *Spectrochim. Acta, Part A* **2003**, 59, 1605.
- Yi, P.-G.; Liu, J.-F.; Shang, Z.-C.; Yu, Q.-S. *J. Spectrosc. Spec. Anal.* **2001**, 21, 826 (in Chinese). (易平贵, 刘俊峰, 商志才, 俞庆森, 光谱学与光谱分析, **2001**, 21, 826.)
- Bi, S.-Y.; Song, D.-Q.; Kan, Y.-H.; Xu, D.; Tian, Y.; Zhou, X.; Zhang, H.-Q. *Spectrochim. Acta, Part A* **2005**, in press.
- Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy*, Ed.: Deway, T. G., Plenum, New York, **1991**, pp. 1~41.
- Lakowica, J. R.; Weber, G. *Biochemistry* **1973**, 12, 4161.
- Ware, W. R. *J. Phys. Chem.* **1962**, 66, 455.
- Ross, D. P.; Sabramanian, S. *Biochemistry* **1981**, 20, 3096.

(A0502186 CHENG, B.; FAN, Y. Y.)