

荧光光谱法研究锌(II)存在下诺氟沙星与牛血清白蛋白的结合作用

吴根华^{1,2}, 汪 婕^{1,2}, 陈金龙¹, 郭 畅¹, 王培三^{1,2}, 王冬香^{1,2}, 汪竹青^{1,2}

1. 安庆师范学院化学化工学院, 安徽 安庆 246003
2. 安徽师范大学化学与材料学院, 安徽 芜湖 241000

摘 要 在模拟生理条件下,用荧光光谱法研究了诺氟沙星对牛血清白蛋白以及锌(II)对诺氟沙星和牛血清白蛋白荧光光谱特性的影响。实验结果表明,诺氟沙星和锌(II)都可以使牛血清白蛋白的荧光强度发生猝灭。根据荧光猝灭双倒数图计算诺氟沙星和牛血清白蛋白之间的结合常数为 6.80×10^5 , 结合位点数为 1.21。由此可见,诺氟沙星和牛血清白蛋白之间有很强的结合作用,这为诺氟沙星在体内被蛋白质储存和转运提供了条件。并且在锌(II)存在下,诺氟沙星与牛血清白蛋白的结合作用有所增强。荧光猝灭双倒数图计算的结果表明,诺氟沙星和牛血清白蛋白之间的结合常数和结合位点数均随锌(II)浓度的增大而增大。通过对锌(II)、诺氟沙星和牛血清白蛋白的结合反应的研究,进一步探讨了诺氟沙星、锌(II)在生物体内与蛋白质相互作用的机理。

关键词 荧光光谱法; 诺氟沙星; 锌(II); 牛血清白蛋白; 结合作用

中图分类号: R33-33 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2008)04-0913-04

引 言

诺氟沙星[1-乙基-6-氟-1,4-二氢-4-氧代-7-(1-哌嗪基)喹啉-3-羧酸](Norfloxacin)为全化学合成广谱氟喹诺酮类抗菌药。对革兰阴性菌、金黄色葡萄球菌有很强的杀菌作用,临床广泛用于肠道、胆道及泌尿系统等感染,是目前应用最为普遍和安全的抗菌素。锌是具有生物作用的最重要的金属之一。锌能促进人体内淋巴细胞增殖,维持上皮和粘膜组织正常作用。而人体缺锌会引起伤口不易愈合、皮肤及粘膜溃疡、嗅觉迟钝、发育不良,并直接影响骨骼及性能发育^[1,2]。本文在研究了诺氟沙星对牛血清白蛋白的荧光猝灭作用机制的基础上,进一步探讨锌(II)存在下诺氟沙星与牛血清白蛋白间结合常数的变化,阐明了锌(II)的浓度对诺氟沙星和蛋白质结合作用的影响。这对于更全面地了解药物在体内与白蛋白的结合情况具有重要意义。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

F-4500 荧光分光光度计(日本日立公司); pHS-3C 型酸度计(上海大中分析仪器厂); FA2004 电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

诺氟沙星(NFLX, 化学对照品, 中国药品生物制品检定所), 牛血清白蛋白(BSA, 生化试剂, 中国医药集团上海化学试剂公司), 三羟甲基氨基甲烷(Tris, 分析纯, 中国医药集团上海化学试剂公司), 盐酸、氯化钠、七水硫酸锌均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水, 无荧光杂质。BSA 溶液浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 以 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.40 Tris-HCl 溶液配制, 以 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 维持离子强度。NFLX 溶液: 浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 以 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.40 Tris-HCl 溶液配制。ZnSO₄ 溶液 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2 实验方法

以 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$; Spectrum Type, EM; Sample Pitch, 1.0; Slit Width, 5.0 nm; Scan Speed, $1200 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$; PMT voltage, 400 V 为荧光参数。

(1)分别测定 a: BSA($1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$); b: BSA 与 NFLX(1.0×10^{-5} ; $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的混合物; c: Zn²⁺ 和 BSA-NFLX(1: 1)的混合物; d: NFLX(1.0×10^{-5}

收稿日期: 2006-12-02, 修订日期: 2007-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(20371002), 安徽省教育厅自然科学基金项目(2002KJ201)资助

作者简介: 吴根华, 1962年生, 安徽师范大学化学与材料学院和安庆师范学院化学化工学院教授 e-mail: wugenh@aqtc.edu.cn

$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的荧光发射光谱(图 1); (2) 在 6 个 10 mL 容量瓶中, 均加入 1 mL pH 7.40 Tris-HCl 溶液缓冲溶液和 1 mL $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA, 再依次加入 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mL $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NFLX, 以二次蒸馏水定容至刻度, 摇匀静置 10 min 后, 取样测定其荧光发射强度, 结果见表 1; (3) 在 (2) 中再加 1 mL 浓度分别为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Zn^{2+} , 以二次蒸馏水定容至刻度, 摇匀静置 10 min 后, 取样测定其荧光发射强度。

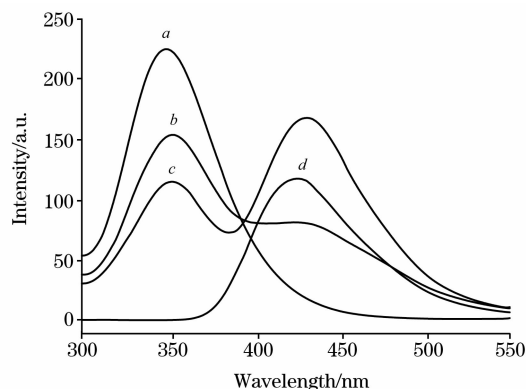


Fig. 1 Emission spectra of samples

a: BSA; b: BSA+NFLX; c: BSA+ NFLX+ZnSO₄; d: NFLX

2 结果与讨论

2.1 NFLX 和 Zn(II) 对 BSA 的猝灭作用

由图 1 可见, 以 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, 在 300~550 nm 范围内 NFLX 的最大发射波长是 426 nm, BSA 的最大发射波长是 349 nm, 分别加入 NFLX 和 Zn(II) 后, BSA 的最大荧光峰位置不变, 但是荧光强度均降低, 这说明 NFLX 和 BSA 以及 Zn(II) 和 BSA 之间存在相互作用, 发生了能量转移, 可见 NFLX 和 Zn(II) 对 BSA 的均有荧光猝灭作用。

2.2 NFLX 和 BSA 的结合作用

由表 1 可见随着 NFLX 浓度的增大, F_0/F 的数值也增大, 即 BSA 的最大荧光发射峰强度逐渐降低, 表明 NFLX 的加入对 BSA 有荧光猝灭作用。

Table 1 Effect of norfloxacin on fluorescence intensity of bovine serum albumin [BSA]: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 7.40, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$

$c_{\text{NFLX}}/10^{-5}$	0.0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
F	225.1	184.2	154.2	128.2	104.0	89.15
F_0/F	1.000	1.222	1.460	1.756	2.164	2.525

引起 BSA 荧光猝灭的原因可能有动态猝灭和静态猝灭。前者是一种能量转移或电子转移过程, 不影响蛋白质的结构和生理活性。后者则是由于发生了配合作用, 通常是产生了不发荧光的配合物, 对蛋白质的二级结构可产生影响, 并可影响其生理活性。荧光猝灭符合

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

式中 K_q 为双分子猝灭过程速率常数, τ_0 是猝灭剂不存

在时生物大分子的平均寿命, $[Q]$ 为猝灭剂即 NFLX 浓度。以 F_0/F 对 $c_{\text{NFLX}}/10^{-5}$ 作出 NFLX 对 BSA 荧光猝灭 Stern-Volmer 图。

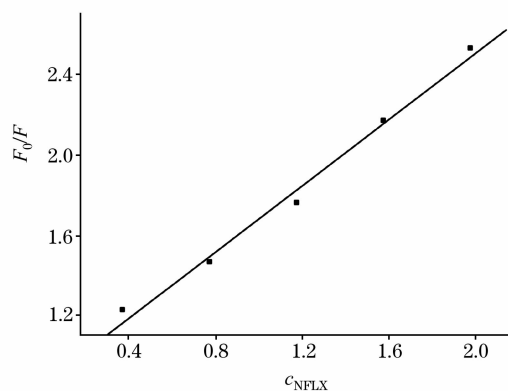


Fig. 2 Plot of F_0/F versus $c_{\text{NFLX}}/10^{-5}$

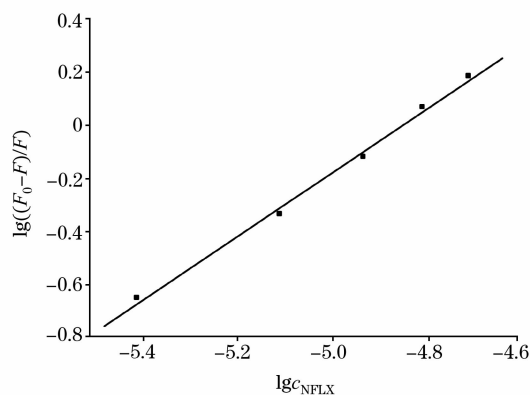


Fig. 3 Plot of $\lg((F_0 - F)/F)$ versus $\lg c_{\text{NFLX}}$

图 2 中曲线有很好的线性关系, 据文献报道生物大分子的荧光寿命约为 $10^{-8} \text{ s}^{[4]}$, 根据实验所得 $K_{\text{sv}} = 82\,762 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 及 (1) 式, 可以算出 NFLX 对 BSA 的荧光猝灭速率常数 $K_q = 8.3 \times 10^{14} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 远远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭速率常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1[4]}$, 所以 NFLX 对 BSA 的猝灭不是由于动态碰撞引起的动态猝灭, 而是由于形成了化合物而引起的静态猝灭^[5], 表明 NFLX 与 BSA 分子间形成了二元配合物。

根据静态猝灭理论^[6]和

$$\lg((F_0 - F)/F) = \lg K + n \lg [Q] \quad (2)$$

K 为药物与白蛋白分子的结合常数, n 为结合位点数。以 $\lg((F_0 - F)/F)$ 对 $\lg c_{\text{NFLX}}$ 作图(图 3), 由图 3 斜率得结合常数为 $K = 6.80 \times 10^5$, 结合位点数 $n = 1.21$, 线性相关系数 $r = 0.9977$, 可见 NFLX 与 BSA 之间具有较强的结合作用, 且可形成一个结合位点。

2.3 Zn(II) 对 NFLX 与 BSA 结合作用的影响

为了进一步探讨 Zn(II) 对 NFLX 与 BSA 结合作用的影响, 研究了在两种不同浓度 Zn(II) 的存在下, NFLX 与 BSA 之间的结合常数 K 和结合位点数 n 的变化情况(即实验方法中的步骤 3)。以 $\lg((F_0 - F)/F)$ 对 $\lg c_{\text{NFLX}}$ 作图, 均得到有

良好线性关系的曲线(图 4 和图 5), 线性方程和相关系数如 表 3。

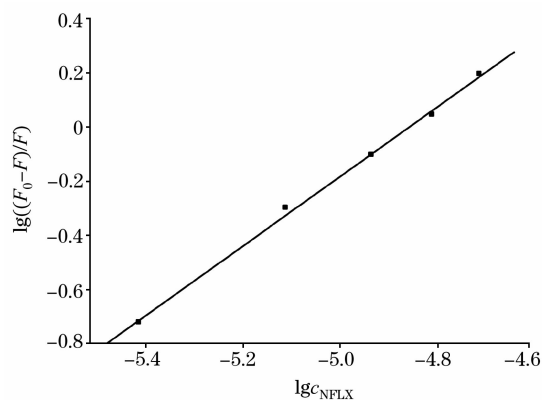


Fig. 4 Plot of $\lg((F_0 - F)/F)$ versus $\lg c_{\text{NFLX}}$ in the presence of $\text{Zn}(\text{II})$ ($c_{\text{Zn}^{2+}} : 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

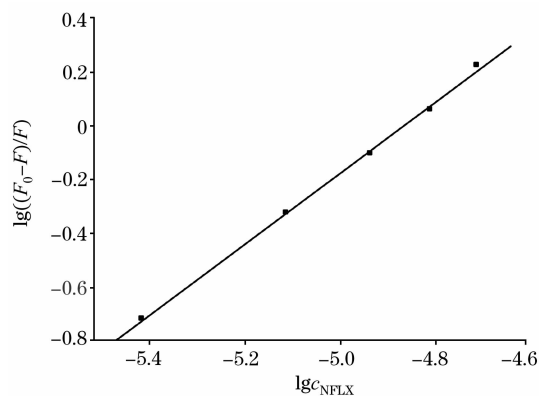


Fig. 5 Plot of $\lg((F_0 - F)/F)$ versus $\lg c_{\text{NFLX}}$ in the presence of $\text{Zn}(\text{II})$ ($c_{\text{Zn}^{2+}} : 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Table 3 Binding constant K and the number of binding site n between norfloxacin and BSA in the presence of different concentration of $\text{Zn}(\text{II})$

$c_{\text{BSA}} : 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{pH} 7.40$, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$

$c_{\text{Zn}^{2+}}$	Linear equation	r	Binding constant(K)	Binding sites(n)
0	$\lg((F_0 - F)/F) = -0.194 + 1.21 \lg c_{\text{NFLX}}$	0.997 7	6.80×10^5	1.21
1.0×10^{-5}	$\lg((F_0 - F)/F) = -0.201 + 1.29 \lg c_{\text{NFLX}}$	0.998 8	1.72×10^6	1.29
1.0×10^{-4}	$\lg((F_0 - F)/F) = -0.169 + 1.37 \lg c_{\text{NFLX}}$	0.9992	2.78×10^6	1.33

由表 3 可见, $\text{Zn}(\text{II})$ 的浓度增大, 提高了 NFLX 与 BSA 的结合常数。据文献[7]报道, NFLX 与某些过渡金属离子 $\text{Zn}(\text{II})$, $\text{Cd}(\text{II})$ 和 $\text{Hg}(\text{II})$ 形成配合物而产生新的荧光光谱。因此, 血液中 $\text{Zn}(\text{II})$ 可能先与药物结合形成配合物, 然后与蛋白质分子结合形成过渡三元配合物, 再脱掉 $\text{Zn}(\text{II})$ 形成药物-BSA 氢键结合物, $\text{Zn}(\text{II})$ 在药物与 BSA 的结合过程中起中介作用, 这一假设支持 Shen^[8] 等提出的过渡金属离子参与 DNA 与药物结合的观点。

3 结 论

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关系是很重要的。药物进入人体后, 总要通过血浆的贮存和运输, 达到受体部位发生药理作用, 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重要影响。血液中金属离子的存在提高了药物与蛋白质的结合常数, 这样便增强了药物与蛋白质的结合力, 使得药物在血浆中的贮留时间延长, 达到缓释的目的, 减小药物的毒性。

参 考 文 献

- [1] HUANG Pei-li, TIAN He-zhen(黄佩丽, 田荷珍). Fundamental Elementary Chemistry(基础元素化学). Beijing: Beijing Normal University Press(北京: 北京师范大学出版社), 1994: 346.
- [2] CAI Shao-hua, HUANG Kun-yao, ZHANG Yu-rong, et al(蔡少华, 黄坤耀, 张玉容, 等). Elementary Inorganic Chemistry(元素无机化学). Guangzhou: Zhongshan University Press(广州: 中山大学出版社), 1998: 212.
- [3] YANG Man-man, YANG Pin, ZHANG Li-wei(杨曼曼, 杨 频, 张立伟). Chinese Science Bulletin(科学通报), 1994, 39(1): 31.
- [4] YAN Cheng-nong, SHANGGUANG Yun-feng, TONG Jin-qiang, et al(颜承农, 上官云凤, 童金强, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(3): 543.
- [5] Alain M, Michel B, Michel A. J. Chem. Edu., 1986, 63(4): 365.
- [6] ZHANG Yong, ZHANG Gui-zhu, WANG Yue-mei, et al(张 勇, 张贵珠, 王月梅, 等). Journal of Analytical Science(分析科学学报), 2000, 16(6): 447.
- [7] HUANG Shu-ping, YANG Man-man, CHEN Liang(黄淑萍, 杨曼曼, 陈 亮). Journal of Instrumental Analysis(分析测试学报), 1995, 14(5): 57.
- [8] Shen L L, Pemat A G. Proceedings of National Academy of Science of the United States of America, 1985, 82: 307.

Bovine Serum Albumin in the Presence of Zinc(II) by Fluorescence Method

WU Gen-hua^{1, 2}, WANG Jie^{1, 2}, CHEN Jin-long¹, GUO Chang¹, WANG Pei-san^{1, 2}, WANG Dong-xiang^{1, 2},
WANG Zhu-qing^{1, 2}

1. College of Chemistry and Chemical Industry, Anqing Teachers College, Anqing 246003, China

2. College of Chemistry and Materials Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China

Abstract The interaction between norfloxacin and bovine serum albumin, and the influence of Zinc(II) on the system of norfloxacin and bovine serum albumin was studied under physiological condition by fluorescence method. It was shown that norfloxacin has a powerful ability to quench the BSA fluorescence via a nonradiative energy transfer mechanism. The fluorescence quenching data were analyzed according to Stern-Volmer equation and double-reciprocal equation, and the binding constant(K) and the binding sites(n) were obtained. In the system of binary complex of NFLX and BSA, $K=6.80 \times 10^5$ and $n=1.21$. There is a strong combination between NFLX and BSA, which offers the condition for the serum protein to be deposited and transported in vivo. Besides, the combination between NFLX and BSA becomes stronger in the presence of Zinc(II). According to Stern-Volmer equation and double-reciprocal equation, the concentration of Zinc(II) is denser, and the binding constant(K) and the binding sites(n) are bigger. By studying the binding interaction between Zinc(II), norfloxacin and BSA, the mechanism of the interaction among norfloxacin, Zinc(II) and protein in organism, is furtherly discussed.

Keywords Fluorescence spectrum; Norfloxacin; Zinc ions; Bovine serum albumin

(Received Dec. 2, 2006; accepted Mar. 6, 2007)