

头孢哌酮和乳酸环丙沙星与人血清白蛋白相互作用的荧光光谱研究^Δ

麻能轩^{1*}, 慕丽晓¹, 李瑞金², 周叶红², 双少敏^{1#} (1.山西大学化学化工学院, 太原 030006; 2.山西大学环境科学研究所, 太原 030006)

中图分类号 R917; R913 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)33-3084-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.33.05

摘要 目的:探讨头孢哌酮(CPZ)、乳酸环丙沙星(CFLX)单独和同时存在时与人血清白蛋白(HSA)的相互作用。方法:采用荧光光谱法研究CPZ、CFLX单独和同时存在时对HSA的荧光猝灭作用,通过Stern-Volmer方程计算猝灭常数(K_q),判断猝灭机制;计算结合常数(K_A)和结合位点数。结果:20、37℃时,HSA-CPZ体系的 K_q 分别为 1.1×10^{12} 、 0.87×10^{12} L/(mol·s);HSA-CFLX体系 K_q 分别为 2.67×10^{12} 、 1.75×10^{12} L/(mol·s)。CPZ和CFLX对HSA的内源性荧光均因形成复合物而产生静态猝灭。20、37℃时HSA-CPZ和HSA-CFLX体系的 K_A 为 $0.11 \times 10^3 \sim 1.79 \times 10^3$ L/mol,结合位点数为0.57~0.75。37℃时,HSA-CFLX-CPZ体系的 K_A 值为 3.47×10^3 L/mol,与HSA-CPZ体系 K_A 值之比为31.55;HSA-CPZ-CFLX体系的 K_A 值为 3.59×10^3 L/mol,与HSA-CFLX体系 K_A 值之比为8.55。结论:CPZ和CFLX同时存在时,一种药物的存在会使另外一种药物与HSA的 K_A 增大、结合稳定性增强,从而致使游离药物的浓度降低,药效下降。

关键词 头孢哌酮;乳酸环丙沙星;人血清白蛋白;静态猝灭;荧光光谱

Study on Interaction of Cefoperazone and Ciprofloxacin Lactate with Human Serum Albumin by Fluorescence Spectrum

MA Neng-xuan¹, MU Li-xiao¹, LI Rui-jin², ZHOU Ye-hong², SHUANG Shao-min¹ (1.College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2.Institute of Environmental Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the interaction of cefoperazone (CPZ) and ciprofloxacin lactate (CFLX) alone or combination with human serum albumin (HSA). METHODS: Fluorescence spectrum was used to investigate the fluorescence quenching effect of CPZ and CFLX alone or combination on HSA. The quenching constants (K_q) were calculated by using Stern-Volmer equation to determine quenching mechanism, and the binding constant (K_A) and the number of binding site were obtained. RESULTS: At 20 °C and 37 °C, K_q of HSA-CPZ were 1.1×10^{12} , 0.87×10^{12} L/(mol·s); K_q of HSA-CFLX were 2.67×10^{12} , 1.75×10^{12} L/(mol·s). CPZ and CFLX could cause the static quenching of HSA endogenous fluorescence due to forming compound. At 20 °C and 37 °C, K_A of HSA-CPZ and HSA-CFLX were 0.11×10^3 - 1.79×10^3 L/mol and binding sites of them were 0.57-0.75. At 37 °C, K_A of HSA-CFLX-CPZ was 3.47×10^3 L/mol, and ratio of it to K_A of HSA-CPZ was 31.55; K_A of HSA-CPZ-CFLX was 3.59×10^3 L/mol, and ratio of it to K_A of HSA-CFLX was 8.55. CONCLUSIONS: CPZ and CFLX in the ternary system, the presence of one drug would enhance the binding constant and stability of the other drug with HSA, which induces the concentration of free drug decreasing and the efficacy of the drugs could be reduced.

KEY WORDS Cefoperazone; Ciprofloxacin lactate; Human serum albumin; Static quenching; Fluorescence spectrum

人血清白蛋白(Human serum albumin, HSA)是血浆中含量最丰富的蛋白质,可与内源性、外源性化合物结合起到存储和转运作用,是药物分布的重要载体^[1]。目前,研究药物与HSA相互作用的方法非常多,如荧光光谱法^[2]、电化学法^[3]、高效液相色谱法^[4]、毛细管电泳法^[5]、红外光谱^[6]、圆二色光谱^[7]和分子模拟^[8]等方法,绝大多数的研究限于一种药物与HSA的相互作用,两种或两种以上联用药物的研究却鲜有报道。笔者认为倪永年等^[9]、刘保生等^[10]的研究较为典型,故以此为参考。

头孢哌酮(Cefoperazone, CPZ)为第3代β-内酰胺类抗菌药物,对大多数革兰阴性菌均有较强抑菌作用,而抗阳性菌作用较弱。乳酸环丙沙星(Ciprofloxacin lactate, CFLX)是一种对革兰阳性杆菌和革兰阴性菌均有较强抑菌作用的氟喹诺酮

类抗菌药物。CPZ和CFLX单独与HSA和牛血清白蛋白的作用已有文献报道^[11-12],临床上常将二者联用以治疗敏感菌引起的呼吸系统、生殖泌尿系统、胃肠道感染等,目前尚未见二者同时与HSA相互作用的研究。本文采用荧光光谱法研究CPZ、CFLX单独和同时存在时与HSA的相互作用,为临床上合理的联合用药提供理论依据。

1 材料

F-4500型荧光光谱仪(日本日立公司);pHS-3C数字酸度计(上海雷磁分析仪器厂);DK-98-I电子恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);Molecular-1820C超纯水净化仪(上海摩勒科学仪器有限公司)。

HSA(卫生部上海生物制品研究所,批号:9301,纯度:>95%);CPZ标准品(批号:0420-200304,纯度:94.4%)、CFLX标准品(批号:0451-200302,纯度:84.9%)均来自中国食品药品检定研究院;Tris-HCl缓冲液(pH 7.4,北京索莱宝科技有限公司);NaCl等试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

2 方法

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.21175087)

* 硕士研究生。研究方向:药物分析。E-mail: 201122906002@mail.edu.cn

通信作者:教授,博士。研究方向:分析化学。E-mail: smshuang@sxu.edu.cn

2.1 溶液的配制

HSA溶液的配制:准确称取66.5 mg HSA,溶于10 ml水中,配成浓度为 1.0×10^{-4} mol/L的贮备液,置于4 °C的冰箱中保存。

标准溶液的配制:准确称取6.5 mg CPZ标准品(或4.2 mg CFLX标准品)于10 ml量瓶中,用水溶解并稀释至刻度后摇匀,即得浓度为0.001 mol/L的CPZ(或CFLX)标准溶液。

2.2 HSA-CPZ或HSA-CFLX体系荧光光谱测定

向10 ml比色管中依次加入2.0 ml 0.5 mol/L NaCl,5 ml 0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液,1.0 ml 1.0×10^{-4} mol/L HSA溶液和不同体积的CPZ(或CFLX)标准溶液,用蒸馏水稀释至刻度,制成CPZ(或CFLX)浓度分别为 $0, 2.0 \times 10^{-5}, 4.0 \times 10^{-5}, 6.0 \times 10^{-5}, 8.0 \times 10^{-5}, 1.0 \times 10^{-6}, 1.2 \times 10^{-6}, 1.4 \times 10^{-6}, 1.6 \times 10^{-6}$ mol/L, HSA浓度均为 1.0×10^{-5} 的溶液,摇匀后室温下静置10 min。选择激发和发射狭缝宽度分别为2.5 nm和5 nm,以289 nm为荧光激发波长,发射波长356 nm下扫描其荧光光谱。同时考察在20、37 °C下两体系的荧光猝灭情况,分析猝灭机制和对HSA的相互作用力,并计算结合常数(K_A)和结合位点数(n)。

2.3 HSA-CPZ-CFLX共存体系荧光光谱测定

向10 ml比色管中依次准确加入2.0 ml 0.5 mol/L NaCl溶液、5 ml 0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液、1.0 ml 1.0×10^{-4} mol/L HSA溶液和1.0 ml 1.0×10^{-4} mol/L CPZ(或CFLX)标准溶液,分别依次加入不同体积的CFLX(或CPZ)标准溶液,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀后室温下静置10 min。在“2.2”项条件下扫描其荧光光谱,并考察37 °C下CPZ对HSA-CFLX、CFLX对标准HSA-CPZ体系的影响。

3 结果与分析

3.1 HSA-CPZ、HSA-CFLX体系的荧光光谱

在pH为7.4的Tris-HCl缓冲液中,CPZ-HSA和CFLX-HSA体系的荧光光谱见图1、图2[1~9依次为CPZ(或CFLX)浓度分别为 $0, 2.0 \times 10^{-5}, 4.0 \times 10^{-5}, 6.0 \times 10^{-5}, 8.0 \times 10^{-5}, 1.0 \times 10^{-6}, 1.2 \times 10^{-6}, 1.4 \times 10^{-6}, 1.6 \times 10^{-6}$ mol/L的溶液]。

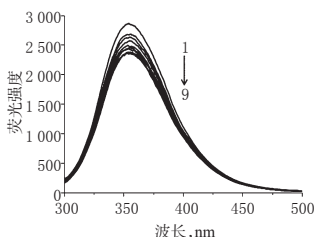


图1 不同浓度HSA-CPZ的荧光光谱

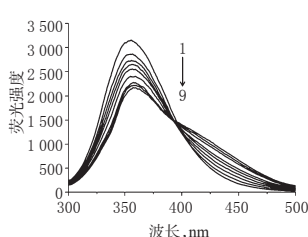


图2 不同浓度HSA-CFLX的荧光光谱

Fig 1 Fluorescence spectrum of different concentrations of HSA-CPZ Fig 2 Fluorescence spectrum of different concentrations of HSA-CFLX

由图1可知,HSA在356 nm波长处有最大荧光发射峰,加入CPZ后HSA的内源性荧光发生猝灭,且强度有规律地下降。由图2可知,随着CFLX浓度的增大,HSA的荧光发射峰有规律地降低,最大发射峰峰位置略有红移。在445 nm波长处可见CFLX的荧光发射峰,且在390 nm波长处有一等发射点,说明平衡溶液中同时存在结合和游离的药物。

3.2 猝灭机制

荧光猝灭分为动态猝灭和静态猝灭。对于动态猝灭,随着温度的升高,能量转移加剧,荧光物质的猝灭常数增大,但对HSA的二级结构和生理活性不会产生任何影响;若是静态

猝灭,温度升高则形成复合物的稳定性降低,且HSA的结构或生理活性发生变化,使猝灭常数减小。笔者分别测定了20、37 °C下,CPZ(或CFLX)对HSA内源性荧光的猝灭情况,并根据Stern-Volmer方程作图,结果见图3、图4。

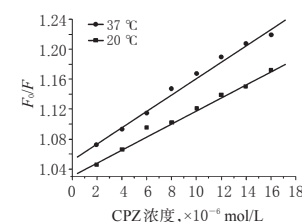


图3 20、37 °C时不同浓度HSA-CPZ荧光光谱的Stern-Volmer曲线

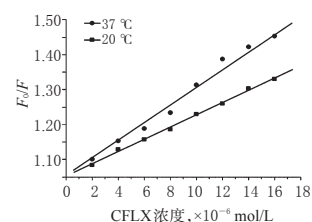


图4 20、37 °C时不同浓度HSA-CFLX荧光光谱的Stern-Volmer曲线

Fig 3 Stern-Volmer plot for fluorescence spectrum of different concentrations of HSA-CPZ at 20 °C and 37 °C Fig 4 Stern-Volmer plot for fluorescence spectrum of different concentrations of HSA-CFLX at 20 °C and 37 °C

从图3、图4可以看出, F_0/F 随着CPZ(或CFLX)浓度的增加逐渐增大, F_0/F 与CPZ(或CFLX)浓度的线性关系良好。假设引起HSA荧光强度下降的机制为动态猝灭,则猝灭方程为:

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

式中, F_0 表示无猝灭剂时HSA的荧光强度; F 表示猝灭剂浓度为 Q 时HSA的荧光强度; K_{sv} 是Stern-Volmer猝灭常数; K_q 为动态猝灭速率常数; τ_0 是无猝灭剂时生物分子的荧光寿命,约为 10^{-8} s。因此,可由猝灭曲线的斜率求得 K_q 。结果,当温度为20、37 °C时,HSA-CPZ体系中 K_q 分别为 $1.1 \times 10^{12}, 0.87 \times 10^{12}$ L/(mol·s), r 为0.996 8、0.994 0;HSA-CFLX体系中 K_q 分别为 $2.67 \times 10^{12}, 1.75 \times 10^{12}$ L/(mol·s), r 为0.995 0、0.993 7。 K_q 均远大于各类荧光猝灭剂对生物大分子的最大 K_q 值即 2.0×10^{10} L/(mol·s)^[13]。由此表明,CPZ(或CFLX)引起HSA内源性荧光猝灭不是由于碰撞引起的动态猝灭,而是因形成复合物引起的静态猝灭。

3.3 K_A 和 n

由于CPZ(或CFLX)对HSA的荧光猝灭过程为静态猝灭,因此,HSA的荧光强度与猝灭剂CPZ(或CFLX)的关系可由下式表达:

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

根据式(2),以 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 作图可得一直线。

通过该直线的截距和斜率可求得CPZ(或CFLX)与HSA的 K_A 及 n ,结果见表1。

表1 CPZ(或CFLX)与HSA的 K_A 和 n
Tab 1 Binding constants and binding sites of HSA with CPZ (or CFLX)

体系	温度, °C	$K_A, L/mol$	r	n
HSA-CPZ	20	0.18×10^3	0.996 5	0.63
	37	0.11×10^3	0.991 6	0.57
HSA-CFLX	20	1.79×10^3	0.995 0	0.65
	37	1.42×10^3	0.989 9	0.75

表1所示,随着温度上升 K_A 有所下降,但 n 的差异不明显,这表明CPZ(或CFLX)与HSA有较强的结合作用,有1个独立的结合位点,且温度对其影响不明显。

3.4 CPZ(或CFLX)分别与HSA的相互作用力

药物与生物大分子的作用力类型包括氢键、范德华力、静电引力和疏水作用力等,其具体类型可以通过热力学参数焓

变(ΔH)和熵变(ΔS)的相对大小判断。温度变化时的 ΔH 、 ΔS 由式(3)、(4)计算,进而得到不同温度下反应的自由能(ΔG)。

$$\ln(K_2/K_1) = H(1/T_2 - 1/T_1)/R \quad \dots\dots\dots (3)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT\ln K \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中, R 是气体常数; T_1 、 T_2 分别为20、37℃的绝对温度; K_1 、 K_2 为与之对应的结合常数; K 为温度 T 下的表观结合常数。计算结果得,37℃时HSA-CPZ和HSA-CFLX体系的 ΔH 、 ΔS 、 ΔG 分别为 -2.04×10^4 、 -6.03×10^4 J/mol, 26.7、144 J/(mol·K), 28.68、104.94 J/mol,由此可知CPZ(或CFLX)与HSA之间的作用力均为静电引力。

文献^[11]报道当 $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ 时,主要作用力为疏水作用力;当 $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$ 时,主要作用力为氢键和范德华力;当 $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$ 时,主要作用力为静电引力。

3.5 CPZ、CFLX对HSA-CFLX、HSA-CPZ体系的影响

为了考察HSA-CPZ-CFLX(或HSA-CFLX-CPZ)体系中两种药物的相互影响,在生理温度37℃下,分别固定HSA和CPZ(或CFLX)的浓度为 1.0×10^{-5} mol/L,加入不同浓度的CFLX(或CPZ),根据Stern-Volmer方程作图,结果见图5、图6。

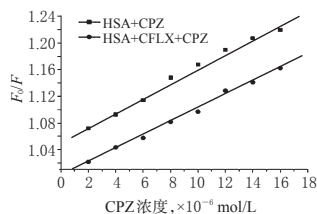


图5 CFLX存在下不同浓度HSA-CPZ体系荧光光谱的Stern-Volmer曲线

Fig 5 Stern-Volmer plot for fluorescence spectrum of different concentrations of HSA-CPZ in the presence of CFLX

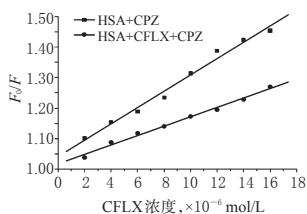


图6 CPZ存在下不同浓度HSA-CFLX体系荧光光谱的Stern-Volmer曲线

Fig 6 Stern-Volmer plot for fluorescence spectrum of different concentrations of HSA-CFLX in the presence of CPZ

按式(2),计算CPZ(或CFLX)存在时CFLX(或CPZ)与HSA的 K_A 值,结果HSA-CPZ、HSA-CFLX-CPZ、HSA-CFLX、HSA-CPZ-CFLX体系的 K_A 分别为 0.11×10^3 、 3.47×10^3 、 1.42×10^3 、 3.59×10^3 L/mol, HSA-CFLX-CPZ(或HSA-CPZ-CFLX)体系与HSA-CPZ(或HSA-CFLX)体系的 K_A 值之比分别为31.55、8.55。HSA-CFLX-CPZ与HSA-CPZ的 K_A 之比为31.55,表明CFLX的存在可以使CPZ与HSA的结合稳定性增强,即CFLX的存在使CPZ游离药物浓度降低;HSA-CPZ-CFLX与HSA-CFLX的 K_A 之比为8.55,同理表明CPZ存在时CFLX与HSA的结合稳定性增强,即CPZ的存在使CFLX游离药物浓度降低。这说明,在本试验条件下,CPZ与CFLX共存时可相互作用,致使体内游离药物浓度发生变化,且CFLX对HSA-CPZ体系的影响远大于CPZ对HSA-CFLX体系的影响。

倪永年等^[9]研究了环丙沙星和头孢拉定与牛血清白蛋白的相互作用,发现一种药物存在时,另一种药物与牛血清白蛋白的结合稳定性增强,使后者游离浓度降低。而刘保生等^[10]研究了环丙沙星、氧氟沙星与牛血清白蛋白的相互作用,结果显示,两种药物间存在相互作用,可使药物与蛋白间的 K_A 减小、结合稳定性下降,使游离药物浓度增加,药效增强。这些研究表明,不同药物化学结构和性质不同,其与HSA的相互作用结果则不同,也就是说,药物联用时,其游离药物浓度及其药效会发生不同的变化。

4 讨论

抗菌药物是临床上最常用的处方药之一,其联合用药也较为常见。本文采用荧光光谱法分别研究了CPZ、CFLX单独和同时存在时与HSA的相互作用,通过Stern-Volmer方程计算猝灭常数,判断猝灭机制;计算 K_A 和 n ,并以热力学参数 ΔH 和 ΔS 的相对大小判断其相互作用力类型。结果表明,在pH 7.4的Tris-HCl缓冲液中,CPZ和CFLX对HSA的内源性荧光均因形成复合物而产生静态猝灭, n 接近1。当CPZ与CFLX同时存在时二者与HSA会产生相互作用,即其中一种药物的存在会使另外一种药物与HSA的 K_A 增大,结合稳定性增强,从而使该药物的游离浓度降低,药效下降。

本研究结果为CPZ与CFLX合理的临床联用提供了实验依据,但其联用对药效影响的机制还有待于深入的探讨和研究。

参考文献

- [1] 张英霞,张云.血清白蛋白的功能及应用[J].海南大学学报:自然科学版,2007,25(3):315.
- [2] Abbul BK, Javed MK, Mohd SA, et al. Interaction of amphiphilic drugs with human and bovine serum albumins [J]. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2012, 97: 119.
- [3] 陈敬华,张静,蔡婉婷,等.一种吡啶酮衍生物的合成及与蛋白质相互作用的电化学行为研究[J].分析化学,2008,36(11):1488.
- [4] 周大伟,王怀锋,李发美.格列美脲蛋白结合作用的高效液相色谱-迎头分析法[J].药学学报,2005,40(1):39.
- [5] 周新,汪子明,邹明强,等.亲和毛细管电泳法测定3种黄酮类化合物与人血清白蛋白的结合常数[J].吉林大学学报:理学版,2005,43(5):669.
- [6] Abuteir MM, Ghithan JH, Darwish SM, et al. Study of progesterone interaction with human serum albumin: spectroscopic approach[J]. *Journal of Applied Biological Sciences*, 2011, 5(1):35.
- [7] 裴明砚,郑学仿,曹洪玉,等.3-溴丙酮酸与人血清白蛋白相互作用的光谱学研究[J].分析化学,2010,38(7):948.
- [8] Jiang H, Chen RR, Pu HL. Study on the interaction between tabersonine and human serum albumin by optical spectroscopy and molecular modeling methods[J]. *Journal of Luminescence*, 2012, 132(3):592.
- [9] 倪永年,刘秋红.荧光光谱法研究环丙沙星和头孢拉定与牛血清白蛋白的协同作用[J].南昌大学学报,2011,35(4):343.
- [10] 刘保生,薛春丽,王晶,等.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[J].发光学报,2010,31(2):285.
- [11] 刘洛生,张虞毅,王兴坡.头孢哌酮与人血清白蛋白相互作用机制[J].光谱学与光谱分析,2005,25(9):1490.
- [12] 贾丽华,曾晓丹,郭祥峰,等.荧光法研究乳酸环丙沙星与牛血清白蛋白的相互作用[J].分析测试学报,2006,25(5):69.
- [13] 张丽娜,陈欣,夏阳,等.荧光光谱法研究四苯基-锌金属卟啉与蛋白质的相互作用机理[J].光谱学与光谱分析,2009,29(3):773.
- [14] 叶蕾,胡卢丰,杜晓翔,等.荧光光谱法分析米诺环素与人血清蛋白的相互作用[J].医药导报,2011,30(12):1651.

(收稿日期:2013-01-09 修回日期:2013-06-25)