

## 荧光光谱法研究氟咯沙星-锌(II)-牛血清白蛋白的三元配合物

吴根华, 汪 婕, 郭 畅, 王冬香, 赵婷婷

安庆师范学院化学与环境科学学院, 安徽 安庆 246011

**摘要** 在模拟生理条件下,用荧光光谱法研究了氟咯沙星对牛血清白蛋白,锌(II)对牛血清白蛋白以及锌(II)对氟咯沙星和牛血清白蛋白荧光光谱特性的影响。锌(II)和氟咯沙星均可使牛血清白蛋白的荧光强度发生猝灭,但是在锌(II)存在下,氟咯沙星对牛血清白蛋白的荧光猝灭作用显著增强。根据荧光猝灭双倒数图计算氟咯沙星和牛血清白蛋白之间的结合常数  $5.44 \times 10^4$ , 结合位点数是 1.05; 锌(II)和牛血清白蛋白之间的结合常数是  $2.19 \times 10^9$ , 结合位点数是 2。

**关键词** 荧光猝灭光谱; 氟咯沙星(FLRX); 锌(II); 牛血清白蛋白(BSA); 二元配合物; 三元配合物

**中图分类号:** O657 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2007)04-0765-04

### 引言

氟咯沙星(fleroxacin, FLRX)是1987年合成的第3代喹诺酮类抗菌素,在临床上治疗各类感染取得良好疗效<sup>[1,2]</sup>。FLRX分子有一个较大的共轭体系和刚性平面结构,因而它是一个较好的吸光基团,并且具有较强的内源荧光。

锌是具有生物作用的最重要的金属之一。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,并直接影响骨骼发育及性能发育<sup>[3,4]</sup>。

采用荧光光谱法分别从定性和定量上对金属离子与血清白蛋白的相互作用以及药物分子与血清白蛋白的相互作用的研究目前比较多,文献已经报道了  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  和稀土离子等与血清白蛋白以及各种沙星与血清白蛋白的相互作用,研究了它们的结合部位、稳定常数、配位情况以及对它们协同性的分析。但对金属离子、沙星和血清白蛋白三元配合物体系的研究较少。本文应用荧光光谱法研究了氟咯沙星与牛血清白蛋白二元配合物、锌(II)与牛血清白蛋白二元配合物以及氟咯沙星、锌(II)和牛血清白蛋白三元配合物。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器与试剂

仪器: RF-5301PC 荧光分光光度计(日本岛津公司); pH-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); 微量进样器(10  $\mu\text{L}$ , 上海安

亭微量进样器仪器厂)。

试剂: 氟咯沙星(FLRX, 中国药品生物制品检定所); 牛血清白蛋白(中国医药集团上海化学试剂公司); 三羟甲基氨基甲烷(Tris)(国药集团试剂有限公司)、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: 以  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 7.0 的 Tris-HCl 溶液配制,以  $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 维持离子强度,浓度为  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。FLRX 溶液: 以  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 7.0 的 Tris-HCl 溶液配制,浓度为  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。ZnSO<sub>4</sub> 溶液:  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液。

#### 1.2 实验方法

(1)分别取一定量的 BSA( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), FLRX ( $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 以及  $[\text{BSA}] : [\text{FLRX}] = 1 : 1$  和  $[\text{BSA}] : [\text{ZnSO}_4] = 1 : 1$  的混合物于四个比色皿中,以  $\lambda_{\text{ex}} = 283 \text{ nm}$ ; Spectrum Type: EM; Sample Pitch: 1.0; Slit Width: 5.0 nm; Scan Speed: Fast; Sensitivity: Low 测定其荧光发射光谱(见图 1)。

(2)取 2.5 mL BSA 于石英比色皿中,用微量进样器逐次加入 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 和 80  $\mu\text{L}$   $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  FLRX, 以相同的参数测定其荧光发射强度,结果见表 1。

(3)取 2.5 mL BSA 于石英比色皿中,用微量进样器逐次加入 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 和 80  $\mu\text{L}$   $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ZnSO<sub>4</sub>, 以相同的参数测定其荧光发射强度,结果见表 2。

(4)移取 2.5 mL  $[\text{BSA}] : [\text{FLRX}] = 1 : 1$  的混合物于石

收稿日期: 2006-01-09, 修订日期: 2006-05-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(2017001)资助

作者简介: 吴根华, 1962 年生, 安庆师范学院化学与环境科学学院教授

e-mail: wugenh@aqtc.edu.cn

英比色皿中,用微量进样器逐次加入 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 和 80  $\mu\text{L}$   $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{ZnSO}_4$ , 每次加液后, 在室温下振荡 10 min, 以  $\lambda_{\text{ex}} = 283 \text{ nm}$  测定其荧光发射光谱(见图 2), 荧光强度结果见表 3, 同时做试剂空白。

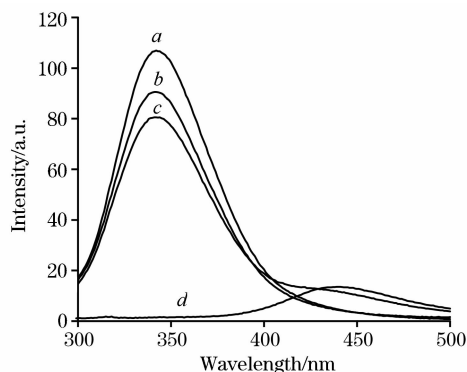


Fig. 1 Emission spectra of samples spectrum

a: BSA; b: BSA+ $\text{ZnSO}_4$ (1:1); c: BSA+FLRX(1:1); d: FLRX

## 2 结果与讨论

### 2.1 FLRX 和 $\text{Zn}(\text{II})$ 对 BSA 的猝灭作用

以  $\lambda_{\text{ex}} = 283 \text{ nm}$ , 在 300~500 nm 范围内 FLRX 的最大发射波长是 438 nm, BSA 的最大发射波长是 343 nm, 分别加入 FLRX 和  $\text{Zn}(\text{II})$  后, BSA 的最大荧光峰位置不变, 但是荧光强度均降低(见图 1), 这说明 FLRX 和 BSA 之间以及  $\text{Zn}(\text{II})$  和 BSA 之间存在相互作用, 发生了能量转移, 可见 FLRX 和  $\text{Zn}(\text{II})$  对 BSA 的荧光产生猝灭作用。

### 2.2 FLRX 对 BSA 的猝灭作用

荧光猝灭作用有动态猝灭和静态猝灭两类, 在动态猝灭过程中, 用动态猝灭常数  $K_{\text{sv}}$  来描述荧光体荧光强度与猝灭剂之间的相互作用关系, 以动态猝灭的 Stern-Volmer 方程处理, 即

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

式中  $F_0$  为未加入 FLRX 时 BSA 的荧光强度,  $F$  是加入 FLRX 作用后 BSA 的荧光强度,  $K_q$  为双分子猝灭过程速率常数,  $\tau_0$  是猝灭剂不存在时生物大分子的平均寿命,  $[Q]$  为猝灭剂即 FLRX 浓度。由表 1 可见随着 FLRX 浓度的增大, BSA 的最大荧光发射峰强度逐渐降低, 表明 FLRX 的加入对 BSA 有荧光猝灭作用。以  $F_0/F$  对  $[\text{FLRX}]$  作出 FLRX 对 BSA 荧光猝灭 Stern-Volmer 图(见图 2)。

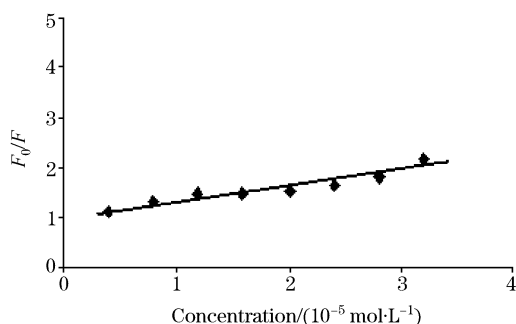


Fig. 2 Plot of  $F_0/F$  versus concentration of FLRX

Table 1 Effect of fleroxacin on fluorescence spectrum of bovine serum albumin [BSA];  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; pH 7.0,  $\lambda_{\text{ex}} = 283 \text{ nm}$

$[\text{FLRX}]/10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$F(343 \text{ nm})$	$F_0/F$
0.0	168.450	1.000
0.4	151.758	1.110
0.8	129.936	1.296
1.2	114.536	1.471
1.6	112.702	1.495
2.0	110.158	1.529
2.4	102.023	1.651
2.8	92.393	1.823
3.2	77.829	2.164

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  $10^{-9} \text{ s}$ <sup>[5]</sup>, 各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数为  $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ <sup>[6]</sup>, 根据实验所得  $K_{\text{sv}} = 43824 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  值代入(1)式, 可以算出 FLRX 对 BSA 的荧光猝灭速率常数  $K_q = 4.3 \times 10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 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, 所以 FLRX 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<sup>[7]</sup>, 表明 FLRX 与 BSA 分子间形成了二元配合物。

根据静态猝灭理论<sup>[8]</sup>, 即

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

式中  $K$  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  $\lg[\text{FLRX}]$  作图(见图 3), 由斜率得结合常数为  $K = 5.44 \times 10^4$ , 结合位点数  $n = 1.05$ , 可见 FLRX 与 BSA 之间具有较强的结合作用, 且可形成一个结合位点。

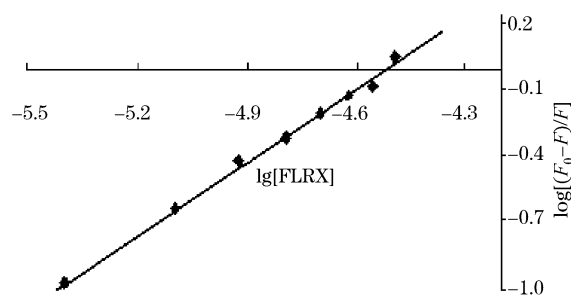


Fig. 3 Plot of  $\lg[(F_0 - F)/F]$  versus  $\lg[\text{FLRX}]$

### 2.3 $\text{Zn}(\text{II})$ 对 BSA 的猝灭作用

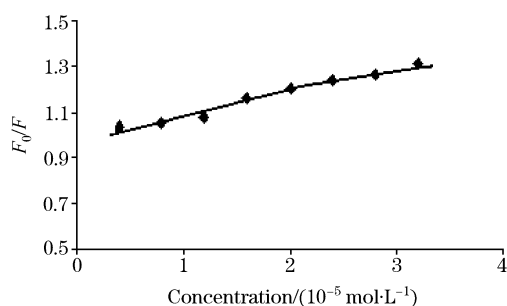
表 2 列出了不同浓度的  $\text{Zn}(\text{II})$  对牛血清白蛋白荧光光谱的影响, 由表 2 可见,  $\text{Zn}(\text{II})$  的加入后, BSA 的最大荧光发射峰位置也降低了, 所以  $\text{Zn}(\text{II})$  对 BSA 的荧光也有猝灭作用。

同样按照动态猝灭的 Stern-Volmer 方程处理, 以表 2 中的  $F_0/F$  对  $[\text{Zn}^{2+}]$  作出  $\text{Zn}(\text{II})$  对 BSA 荧光猝灭 Stern-Volmer 图(见图 4)。

由图 4 可以看到当摩尔比增加时直线有向下弯曲趋势且直线关系渐差, 在摩尔比小于 2 时直线关系非常好。因为随着  $\text{Zn}(\text{II})$  的加入, BSA 发生了荧光猝灭现象, 在较低浓度下

**Table 2** Effect of Zn(II) on fluorescence spectrum of bovine serum albumin [BSA];  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; pH 7.0,  $\lambda_{\text{ex}} = 283 \text{ nm}$

$[\text{Zn}^{2+}]/10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$F(343 \text{ nm})$	$F_0/F$
0.0	184.445	1.000
0.4	178.247	1.035
0.8	174.552	1.057
1.2	170.622	1.081
1.6	158.155	1.166
2.0	153.376	1.202
2.4	148.382	1.243
2.8	145.508	1.268
3.2	140.476	1.313



**Fig. 4** Plot of  $F_0/F$  versus concentration of  $\text{Zn}^{2+}$

以静态猝灭为主,随着浓度比的增大,动态猝灭作用越来越明显。由图4的斜率(摩尔比小于2时)可得Zn(II)与BSA的动态猝灭常数,由式(1)得Zn(II)表观猝灭常数 $K_q = 1.01 \times 10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,也远远大于扩散控制的猝灭常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,由此可证明,Zn(II)对BSA的荧光猝灭属于非动态碰撞引起的猝灭,而是由于形成了化合物而引起的静态猝灭,表明 $\text{Zn}^{2+}$ 与BSA分子间形成了二元配合物。

Zn(II)对BSA的荧光猝灭效应在 $[\text{Zn}^{2+}] : [\text{BSA}] = 2$ 处出现明显拐点,表明BSA应有两类以上的与Zn(II)的结合部位,第一类只能结合两个金属离子<sup>[9]</sup>,即结合位点数 $n=2$ ,形成 $\text{Zn}_2\text{BSA}$ 配合物,在 $[\text{Zn}^{2+}] : [\text{BSA}] \leq 2$ 时,相对荧光强度 $F_0/F$ 的变化与Zn(II)浓度呈线性关系。因此,在室温pH 7.0 Tris-NaCl-HCl缓冲溶液条件下,用荧光法测得Zn(II)与BSA结合的表现结合常数 $K = 2.19 \times 10^9$ 。

#### 2.4 Zn(II)对FLRX与BSA结合作用的影响

表3列出了不同浓度的Zn(II)对FLRX与BSA的荧光光谱的影响,由表3可见Zn(II)的加入,使FLRX与BSA的二元体系的荧光强度逐渐降低,情况表明Zn(II),FLRX与BSA之间形成三元配合物,从而产生了荧光静态猝灭。

为了进一步探讨和证实Zn(II)对FLRX与BSA相互作用的影响,计算在不同浓度的Zn(II)存在时,FLRX与BSA间结合常数的变化(见图5)。由FLRX对BSA的猝灭作用中可知两者的结合位点数 $n=1.05$ ,则

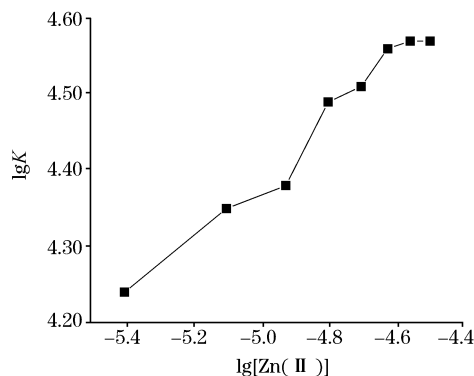
$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K + 1.05 \lg[Q] \quad (3)$$

以 $\lg K$ 对 $\lg(\text{Zn(II)})$ 作图(见图5),从图中可以看出,随着

Zn(II)浓度的增加,FLRX与BSA结合作用增强,至 $\lg[\text{Zn(II)}] \approx -4.5$ 时达到最大。本文的工作在生化领域内是热点课题,有一定的意义。近来,类似的工作亦有报道,例如文献<sup>[10, 11]</sup>。

**Table 3** Effect of Zn(II) on fluorescence spectrum of FLRX-BSA [FLRX]:  $0.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , [BSA]:  $0.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; pH 7.0,  $\lambda_{\text{ex}} = 283 \text{ nm}$ ;  $[\text{Zn}^{2+}] : [\text{FLRX-BSA}] = n_2 : n_1$

$n_2 : n_1$	$F(343 \text{ nm})$
0.0	99.998
0.8	94.828
1.6	83.350
2.4	78.925
3.2	71.279
4.0	69.462
4.8	61.496
5.6	57.749
6.4	56.314



**Fig. 5** The binding constants of FLRX and BSA in the presence of Zn(II) in different concentrations

### 3 结 论

Burstein等<sup>[12]</sup>认为色氨酸的最大荧光发射峰位对环境很敏感,在疏水环境中其最大峰位约为332 nm,完全暴露于水相中时则约为352 nm,部分暴露于水相中时则约为342 nm,由此可以认为FLRX与BSA结合后,使BSA的螺旋结构逐渐舒展开来,从而使色氨酸残基逐渐从蛋白质的疏水环境中暴露出来而进入水相中。而FLRX的荧光峰形和峰位均未发生变化,只是荧光值比未加蛋白质时有所增加,这说明BSA和FLRX的基本结构均未发生变化,只是发生了从色氨酸到FLRX的能量转移,可见FLRX在人体内以其原形发挥作用。Zn(II)在一定范围内,对FLRX与BSA的结合起着重要的中介作用。

Shen等利用同位素示踪的方法,证明氟哌酸作用机理是直接和细菌DNA分子结合<sup>[13]</sup>,并提出药物与DNA的结合是通过铜(II)或铁(II)等过渡金属离子的中介作用来实现的<sup>[14]</sup>,过渡金属离子-氟哌酸配合物首先与细菌碱基DNA

结合, 形成过渡三元配合物后, 最终脱掉金属离子形成药物—DNA 氢键结合物的假设, 本文支持 Shen 等提出的过渡金属离子参与 DNA 与药物结合的观点, 并表明对 Zn(II), FLRX 与 BSA 的结合, 可能采取同样类似的模式。

## 参 考 文 献

- [1] Naber K G. Am. J. Med. , 1993, 94(Sup 3 A): 14.  
 [2] Chodoshs. Am. J. Med. , 1993, 94(Sup 3 A): 31.  
 [3] 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.  
 [4] CAI Shao-hu, 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.  
 [5] Yang P, Yang M M, Yang Bin-sheng. Chin. J. Chem. , 1996, 14: 109.  
 [6] ZHU Keng, TONG Shen-yang(朱 铿, 童沈阳). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 1996, 17(4): 539.  
 [7] Alain M, Michel B, Michel A. J. Chem. Edu. , 1986, 63(4): 365.  
 [8] YAN Cheng-nong, SHANGGUAN 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(5): 544.  
 [9] YANG Bin-sheng, YANG Pin(杨斌盛, 杨 频). Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物进展), 1989, 16(5): 351.  
 [10] HE Hua, YE Hai-ying, DAI Li, et al(何 华, 叶海英, 戴 丽, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(3): 480.  
 [11] LIU Jia-qin, TIAN Jian-niao, BIAN Qing-quan, et al(刘家琴, 田建袅, 边清泉, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(4): 715.  
 [12] YANG Pin, YANG Bin-sheng(杨 频, 杨斌盛). Introduction to the Ionic Probe Methods(离子探针方法导论). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1994. 165.  
 [13] Shen L L, Parnat A G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82: 307.  
 [14] Shen L L, Mitscher L A, Sharma P N, et al. Biochemistry, 1989, 28: 3886.

## Study on the Ternary Complex of FLRX, Zinc( II ) and BSA by the Method of Fluorescence

WU Gen-hua, WANG Jie, GUO Chang, WANG Dong-xiang, ZHAO Ting-ting

Department of Chemistry, Anqing Normal College, Anqing 246011, China

**Abstract** The influences of fleroxacin(FLRX) on the fluorescence of bovine serum albumin(BSA), zinc( II ) on that of bovine serum albumin, and zinc( II ) on the of fleroxacin and bovine serum albumin were studied under imitated the physiological condition. It was shown that both fleroxacin and zinc( II ) have a powerful ability to quench the BSA fluorescence via a nonradiative energy transfer mechanism. But the fluorescence quenching action of fleroxacin on BSA was much stronger in the presence of zinc( II ). 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 FLRX and BSA,  $K=5.44 \times 10^4$  and  $n=1.05$ , while in the system of binary complex of zinc( II ) and BSA,  $K=2.19 \times 10^9$  and  $n=2$ .

**Keywords** Fluorescence spectrum; Fleroxacin; Zinc ions; Bovine serum albumin; Binary complex; Ternary complex

(Received Jan. 9, 2006; accepted May 28, 2006)