

西那沙星与牛血清白蛋白的相互作用及 共存金属离子影响的研究

费燕¹, 陆国才², 范国荣^{1*}, 亓云鹏¹, 吴会灵¹, 吴玉田¹

1. 第二军医大学药学院, 上海市药物代谢产物研究重点实验室, 上海 200433
2. 第二军医大学基础部新药评价中心, 上海 200433

摘要 应用荧光光谱法、紫外分光光度法研究了在不同酸度、温度条件下, 西那沙星(Sinafloxacin)与牛血清白蛋白(bovine serum albumins, BSA)的相互作用, 研究表明: 西那沙星对 BSA 内源荧光的猝灭机制属于形成复合物所引起的静态猝灭, 利用荧光猝灭双倒数图计算了西那沙星与牛血清白蛋白之间的结合常数 K_D , 根据 Förster 非辐射能量转移理论计算出西那沙星与牛血清白蛋白结合时授体-受体间的结合距离 $r = 3.64 \text{ nm}$ 、能量转移效率 $E = 0.163$, 表明两者之间有较强的作用, 并根据热力学参数确定了西那沙星与牛血清白蛋白之间的主要作用力类型为静电作用力, 同时采用同步荧光、三维荧光技术考察了西那沙星对 BSA 构象的影响。此外, 讨论了共存 Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} 对西那沙星与 BSA 结合作用的影响。为探讨西那沙星在生物体内与蛋白质的作用机理和生物学效应提供了理论依据。

关键词 西那沙星; 牛血清白蛋白; 荧光法; 能量转移; 共存离子

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2008)11-2609-06

引言

血清白蛋白是血浆中含量最丰富的载体蛋白, 具有贮运内源代谢产物和外源药物小分子等重要生理功能^[1]。探讨有机小分子与蛋白质等生物大分子的相互作用模式与特征一直是目前生物化学和医学界共同关注和感兴趣的课题。

西那沙星(Sinafloxacin)是我国自主研发的第四代喹诺酮类抗感染新药, 母核的 7 位具有氮杂螺环结构, 抗菌谱广, 尤其对环丙沙星耐药的金葡萄球菌、大肠埃希菌等抗菌活力强, 且细胞毒性显著低于同类产品中的加替沙星和左氧氟沙星, 为临床抗感染治疗提供了新的选择^[2]。目前, 有关西那沙星与生物大分子相互作用的研究还未见报道, 本实验采用光谱法研究了西那沙星与血清白蛋白之间的结合反应, 并选取生物体内四种必需金属元素作为考察对象, 研究其对药物与蛋白结合的影响, 对于从分子水平上了解药物在体内的传输、分布具有重要意义, 为西那沙星的作用机理与毒性研究等提供了可资参考的实验数据与理论根据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Cary Eclipse 型荧光光度计(美国瓦里安公司), Cary50 型紫外-可见分光光度计(美国瓦里安公司), pH5-3B 型酸度计(上海雷磁仪器厂), SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

西那沙星由江苏豪森药业有限公司提供, 贮备液浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 牛血清白蛋白(BSA, 上海华美生物工程公司, 纯度 $> 98\%$, 分子量 68000)贮备液浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 使用前用二次蒸馏水稀释; pH 5.0 的磷酸盐缓冲液, pH 7.4, 8.4 的 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液(Tris 由上海生物化学试剂公司提供), FeCl_3 , CuCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 溶液浓度均为 $1.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 实验所用溶液均以 0.9% 的 NaCl 水溶液配制, 以维持生理条件下的离子强度, 所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水, 经检验无荧光杂质。

收稿日期: 2007-10-08, 修订日期: 2008-01-08

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目(036505016)资助

作者简介: 费燕, 女, 1980 年生, 第二军医大学药学院药物分析教研室硕士研究生 e-mail: feiyanfy@126.com

* 通讯联系人 e-mail: Guofan@yahoo.com.cn

1.2 实验方法

在 10 mL 量瓶中依次加入 5.0 mL 缓冲液、1.0 mL $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 溶液及不同量的 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的西那沙星溶液, 用 0.9% 的 NaCl 水溶液稀释至刻度。将各 pH 下的溶液配制 3 组分别置于 25, 37 和 44 °C 恒温水浴中恒温 4 h 作为待测溶液; 固定激发波长 λ_{ex} 为 280 nm, 发射与激发狭缝均为 5 nm, 扫描 290~550 nm 的发射光谱, 并测定与蛋白质等摩尔数的西那沙星溶液的紫外吸收光谱。固定荧光发射与激发的波长差分别为 $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$, 扫描记录同步荧光光谱。在一定的激发和发射波长范围内, 扫描三维荧光光谱。

2 结果与讨论

2.1 猝灭类型的确定

2.1.1 西那沙星对 BSA 的荧光光谱的影响

蛋白质中色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的存在, 使其具有内源荧光。实验表明在激发波长 280 nm 下, BSA 最大发射波长为 345 nm, 西那沙星的加入使 BSA 的荧光发射强度发生明显降低, 表明两者之间存在相互作用, 发生了能量转移, 图 1 中加入等物质的量的西那沙星后, BSA 的荧光光谱没有畸变, 且 BSA 的存在并未使西那沙星的荧光强度增加, 说明它们之间的能量转移属于非辐射能量转移过程^[3, 4]。固定 BSA 的量, 随着西那沙星浓度的增加, BSA 的内源荧光强度有规律地降低, 出现典型的荧光猝灭现象, 发射峰位及峰形基本不变, 在长波段出现一个等发射点。实验所得荧光猝灭光谱见图 2。

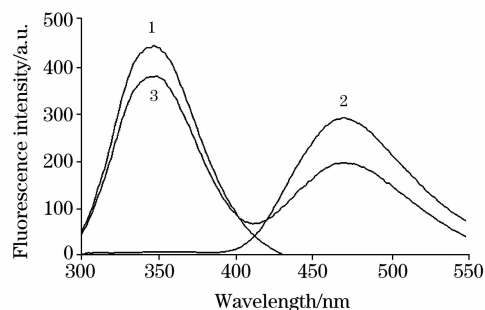


Fig. 1 Fluorescence emission spectra of samples

pH 7.4, $\lambda_{\text{ex}}=280 \text{ nm}$; 1: Bovine serum albumin(BSA);

2: Sinifloxacin; 3: Sinifloxacin+BSA(1:1)

2.1.2 pH 值、温度的影响

一般情况下, 荧光猝灭作用的机制主要有动态猝灭、静态猝灭和发生非辐射能量转移等。动态猝灭常数随温度的升高而增大; 而静态猝灭常数则相反^[5, 6]。分别测定了弱酸性、中性及弱碱性条件下 25, 37 和 44 °C 时西那沙星对 BSA 的荧光猝灭情况。根据 Stern-Volmer 方程^[7]:

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

式中: F_0 和 F 分别是不存在和存在猝灭体时的荧光强度; K_q 为双分子猝灭过程的速率常数; K_{SV} 为 Stern-Volmer 猝灭常数; τ_0 为猝灭剂不存在时分子的平均寿命; $[Q]$ 为荧光猝

灭剂的浓度, 以 F_0/F 对 $[Q]$ 作图, 根据直线斜率求得各种条件下的 K_{SV} , 见表 1。可以看出: 在弱酸性、中性及弱碱性条件下, 随温度升高, K_{SV} 减小, 初步表明猝灭为静态机理。由于生物大分子的荧光平均寿命实验测得的 τ_0 值在 $10^{-9} \sim 10^{-8} \text{ s}$ 之间, 本文取 $\tau_0=10^{-8} \text{ s}$ ^[8], 根据(1)式, $K_q=K_{\text{SV}}/\tau_0$ 求得猝灭速率常数 K_q 。各类猝灭剂对生物大分子最大扩散碰撞猝灭速率常数为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。显然, 西那沙星对 BSA 的猝灭速率常数远大于扩散碰撞猝灭速率常数, 亦可证明, 猝灭不是由于分子碰撞引起的动态猝灭, 而是形成了复合物所引起的静态猝灭。

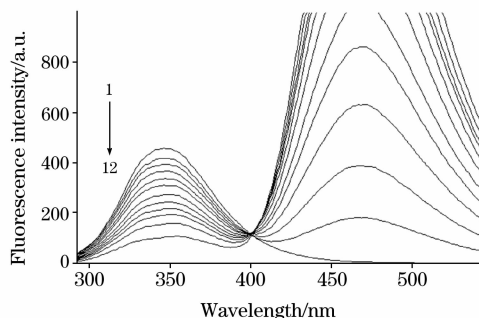


Fig. 2 Fluorescence emission spectra of sinifloxacin and BSA in the presence of various concentrations of sinifloxacin at 37 °C

pH 7.4, $c_{\text{BSA}}: 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{sinifloxacin}}/(10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$, from 1 to 12: 0; 0.4; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 6.0; 8.0; 10.0; 12.0; 16.0; 24.0

Table 1 Stern-Volmer quenching constant of the system of sinifloxacin -BSA at different temperature and pH

pH	T / °C	K_{SV}	K_q	r
		/($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	/($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	
5.0	25	1.327×10^5	1.327×10^{13}	0.995 0
	37	1.302×10^5	1.302×10^{13}	0.997 2
	44	1.279×10^5	1.279×10^{13}	0.993 3
7.4	25	1.293×10^5	1.293×10^{13}	0.992 4
	37	1.286×10^5	1.286×10^{13}	0.998 4
	44	1.239×10^5	1.239×10^{13}	0.992 5
8.4	25	1.215×10^5	1.215×10^{13}	0.986 9
	37	1.191×10^5	1.191×10^{13}	0.993 4
	44	1.153×10^5	1.153×10^{13}	0.996 2

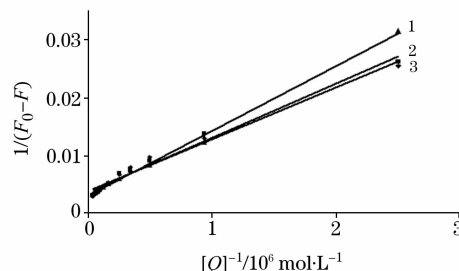


Fig. 3 The Lineweaver-Burk curves for quenching of sinifloxacin with BSA at pH 7.4

1: 44 °C; 2: 37 °C; 3: 25 °C

2.2 结合常数的计算

马贵斌等^[9]推导出利用有机物分子对蛋白质荧光的静态猝灭来求结合常数的方法,指出 F 、猝灭剂浓度 $[Q]$ 、结合常数 K_D 之间的关系可以用 Lineweaver-Burk 双倒数函数表示,即:

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_D^{-1} F_0^{-1} [Q]^{-1} \quad (2)$$

图 3 为 pH 7.4 的双倒数曲线,由直线斜率求得不同温度下的结合常数 K_D ,见表 2。

2.3 西那沙星与 BSA 作用的热力学参数和作用力类型的确定

Table 2 The binding constants and thermodynamic parameters of BSA with sinifloxacin at different temperature and pH

pH	$T/^\circ\text{C}$	$K_D/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	r	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
5.0	25	5.14×10^5	0.995 0	-19.612	43.520	-32.581
	37	4.22×10^5	0.995 1	-19.612	44.428	-33.385
	44	3.20×10^5	0.999 8	-19.612	43.520	-33.408
7.4	25	4.11×10^5	0.990 7	-13.024	63.766	-32.027
	37	3.89×10^5	0.994 7	-13.024	64.996	-33.173
	44	3.00×10^5	0.998 0	-13.024	63.766	-33.238
8.4	25	2.05×10^5	0.990 4	-11.557	62.905	-30.303
	37	1.80×10^5	0.993 3	-11.557	63.325	-31.188
	44	1.55×10^5	0.999 6	-11.557	62.905	-31.498

2.4 结合位置的计算

2.4.1 原理

药物小分子与血清白蛋白结合形成络合物,根据 Förster 理论,可以求出结合位置与蛋白质分子中发光基团之间的距离^[11]。能量转移效率 E 与给体-受体间的距离 r 的关系为

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

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 \cdot n^{-4} \cdot \Phi \cdot J \quad (7)$$

式中 R_0 是能量转移效率, E 为 50% 时的临界距离; K 为偶极空间取向因子; n 为介质的折射指数; Φ 为给体的光量子效率; J 为给体(蛋白)荧光发射光谱与受体(药物)吸收光谱间的光谱重叠部分

$$J = \sum (F(\lambda) \cdot \epsilon(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot \Delta\lambda) / \sum (F(\lambda) \cdot \Delta\lambda) \quad (8)$$

式中 $F(\lambda)$ 为荧光给体在波长 λ 处的荧光强度; $\epsilon(\lambda)$ 为受体在波长 λ 处的摩尔吸收系数,能量转移效率 E 可由下式求出

$$E = 1 - F/F_0 \quad (9)$$

只要得到 E , K^2 和 n 并通过测定光谱求出积分 J , 就可以计算得到 R_0 和 r ^[12, 13]。

2.4.2 临界能量转移距离(R_0)、能量转移效率(E)和给体-受体间距离(r)

分别将一定浓度 BSA 的荧光光谱数据和与 BSA 等物质的量的西那沙星的紫外吸收光谱数据输入 Matlab7.1 得重叠图 4。在此软件中进行处理而求得图中光谱重叠部分的面积,即积分面积 $J = 1.638 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。取向因子取两络合物各项随机分布的平均值 $K^2 = 2/3$, BSA 中色氨酸残基量子效率 $\Phi = 0.15$, 折射指数取水 and 有机物的平均值 $n = 1.336$, 将以上各量带入(7)式,求得临界距离 $R_0 = 2.77 \text{ nm}$,

一般地,药物分子与生物大分子的相互作用力包括疏水作用,静电引力,范德瓦耳斯力、氢键等。根据 Ross^[10]等总结出的判断生物大分子与小分子结合力性质的热力学规律,利用不同 pH 条件下结合常数与温度的关系,通过(3)~(5)式求得 $\Delta G < 0$, 结合反应可以自发进行, ΔS 均为正值, ΔH 均为负值(见表 2),判断其相互作用力主要为静电作用力。

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

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

根据(9)式求得能量转移效率 $E = 0.163$, 进而由 R_0 和 E 按(6)式求出 BSA 中色氨酸残基与西那沙星分子间的距离 $r = 3.64 \text{ nm}$ 。

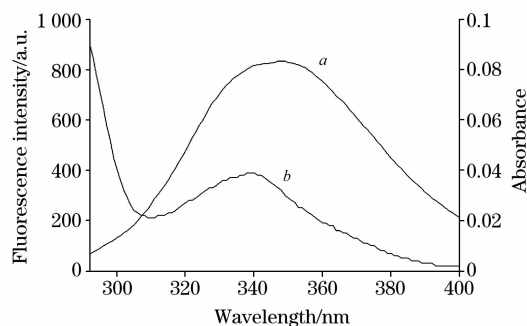


Fig. 4 Overlap of the fluorescence emission spectra of BSA (a) and the UV absorption spectra of sinifloxacin (b)

2.5 西那沙星对 BSA 构象的影响

对于蛋白质的同步荧光光谱, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 只显示酪氨酸的光谱特性, $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 仅表现出色氨酸残基的荧光。蛋白质中氨基酸残基的最大荧光发射波长 λ_{max} 与其所处环境的极性有关,由 λ_{max} 的变化可判断蛋白质构象变化^[14]。

固定蛋白质浓度,逐渐增加西那沙星的浓度,测量 BSA 的同步荧光光谱。图 5(a)和图 5(b)分别为色氨酸和酪氨酸残基的荧光光谱。可以看出随西那沙星浓度的增大,酪氨酸残基的最大发射波长不变,而色氨酸残基的最大发射波长略有蓝移,所处环境的疏水性增加,BSA 的构象发生了变化,形成一种新的无序结构。

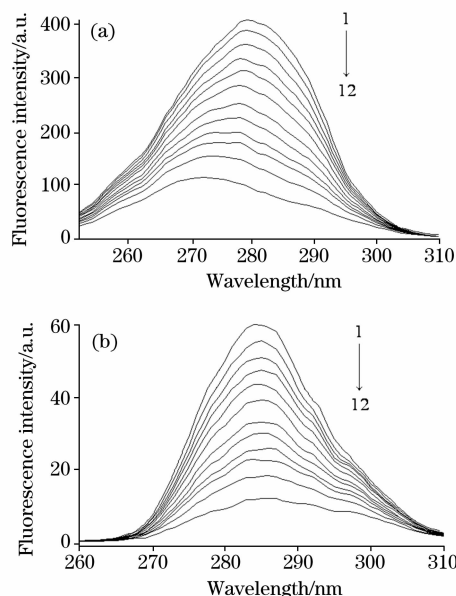


Fig. 5 Synchronous fluorescence spectra of BSA

(a): $\Delta\lambda = 60$ nm; (b): $\Delta\lambda = 15$ nm

$c_{\text{BSA}}: 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{sinifloxacin}}/(10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$;

from 1 to 12: 0, 0.4, 1.0, 2.0, 3.0,

4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 16.0, 24.0

三维荧光光谱能够更加全面地展现样品的荧光信息, 有利综合考查样品的组分分布及构型变化特征^[5, 14]。按照实验方法, 作出 BSA 及 Sinifloxacin-BSA 体系的三维荧光光谱 (见图 6), 对体系 a, b 的三维光谱特征作了比较。从峰的类型看: 图 6 中的两条逐渐升高的“山脊”形峰的共同特征是 $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}} (\Delta\lambda = 0)$, 是瑞利散射峰; $\lambda_{\text{em}} = 345 \text{ nm} (\lambda_{\text{ex}} < \lambda_{\text{em}}, \Delta\lambda < 0)$ 左右的两个“驼峰”形宽峰, 是荧光峰的特征。从峰的位置看: 加入西那沙星前后, BSA 的瑞利散射峰起始位置及荧光峰位置均无显著变化。从峰的强度看: 瑞利散射峰的强度有所升高; 而荧光峰的相对强度均有不同程度的降低。但荧光峰 1 和 2 强度降低的程度是不一样的, BSA 中峰 1 与峰 2 的荧光强度之比为 1.040 3 : 1, 加入西那沙星后, 峰 1 与峰 2 的荧光强度之比为 1.124 : 1, 很显然西那沙星对峰 2 的猝灭作用更为明显。BSA 的空间结构由 3 个结构域组成, 每个结构域由 2 个亚结构域以槽口相对的方式形成圆筒状结构, 几乎所有的疏水性氨基酸残基都包埋在圆筒内部, 构成疏水腔, 西那沙星分子的结合部位可能都处于这种疏水腔中, 正是西那沙星分子的引入导致了这种疏水微环境极性的改变, 进而导致了 BSA 构象的变化。

2.6 共存金属离子对西那沙星与 BSA 结合参数的影响

血清白蛋白结合的共存物质会影响药物与蛋白的结合。人体内含有许多微量元素, 参与了许多重要的生命过程, 其中 Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} 与人类的生存密切相关^[15-17]。实验在 BSA 溶液中加入金属离子组成混合溶液, 分别测定西那沙星对混合体系的荧光猝灭作用, 考察金属离子对西那沙星与 BSA 相互作用的影响。结果表明, 在 Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} 存在的情况下, 减小了药物与蛋白质间的结合

常数, 如表 3 所示。 Mg^{2+} 存在使得结合常数明显减小, 而 Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} 对结合反应的影响程度要小一些。

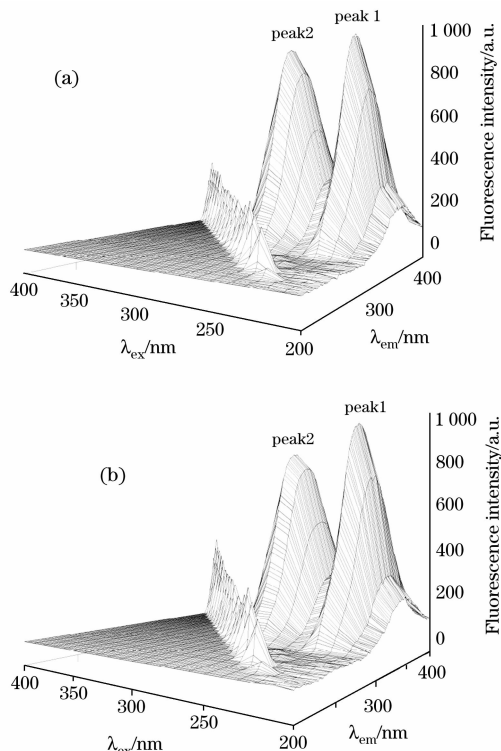


Fig. 6 Three-dimensional fluorescence spectra of BSA (a) and sinifloxacin-BSA system (b)

$c_{\text{BSA}}: 2.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{sinifloxacin}}: 2.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

(a): BSA; (b): Sinifloxacin-BSA

Table 3 The binding constants between BSA and sinifloxacin in the presence of metal ions

	$K'_{\text{D}}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K'_{\text{D}}/K_{\text{D}}$	$1 - (K'_{\text{D}}/K_{\text{D}})$
Cu(II)	3.10×10^5	0.80	0.20
Fe(III)	3.50×10^5	0.90	0.10
Zn(II)	3.60×10^5	0.93	0.07
Mg(II)	1.45×10^5	0.37	0.63

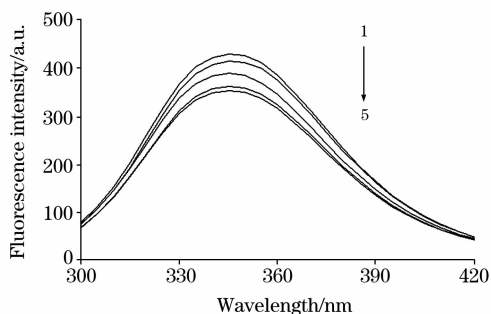


Fig. 7 Fluorescence emission spectra of BSA in the presence of various metal ions

$c_{\text{BSA}} = 1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{Fe}^{3+}} = c_{\text{Cu}^{2+}} = c_{\text{Mg}^{2+}} = c_{\text{Zn}^{2+}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 37°C ; $\text{pH} = 7.4$; $1 \sim 5$: BSA, BSA + Zn^{2+} , BSA + Mg^{2+} , BSA + Cu^{2+} , BSA + Fe^{3+}

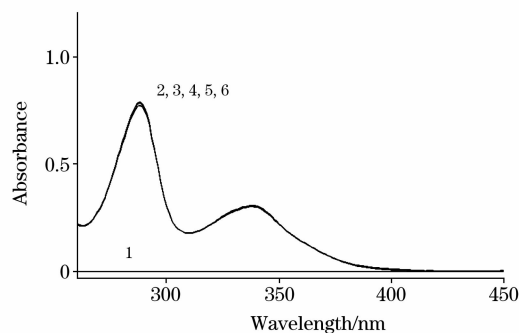


Fig. 8 UV absorption spectra of BSA in the presence of Mg^{2+}

pH=7.4, 37°C, 1: $c_{Mg^{2+}} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

2: $c_{\text{cinoxacin}} = 2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 3~6: $c_{Mg^{2+}} : 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

to $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{cinoxacin}} = 2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

进一步考察金属离子对 BSA 的荧光光谱的影响以及金属离子对西那沙星的紫外吸收光谱的影响, 由图 7 发现加入等浓度上述四种离子, BSA 的荧光发射峰的波长不变, 荧光强度被不同程度地猝灭, 说明金属离子与 BSA 之间存在相互作用。

由图 8 中可以看出随着 Mg^{2+} 浓度的增加, 西那沙星的紫外吸收峰的强度略有降低, 峰位置没有变化, 对于 Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , 也有类似的现象, 表明金属离子对于药物与蛋白之间作用的影响, 主要是由于金属本身与蛋白之间的作用, 产生间接竞争的结果, 由于它们结合位点的差异, 可能主要通过改变白蛋白的构象起作用。结合常数的减小, 缩短了药物在血浆中的储留时间, 增大了药物的最大作用强度, 这对希望短期提高药效的临床治疗有一定的作用。

参 考 文 献

- [1] ZHANG Hai-rong, GUO Si-yuan, LI Lin, et al(张海容, 郭祀远, 李琳, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(6): 829.
- [2] LI Zhi-yuan, LU Guo-cai, YUAN Bo-jun, et al(栗志远, 陆国才, 袁伯俊, 等). Chinese Journal of New Medicine(中国新药杂志), 2006, 15(4): 274.
- [3] SHENG Liang-quan, YAN Xiang-yang, XU Hua-jie, et al(盛良全, 闫向阳, 徐华杰, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(2): 306.
- [4] SHANG Zhi-cai, FAN Cheng-ping, GUO Ming, et al(商志才, 范成平, 郭明, 等). Acta Phys. -Chim. Sinica(物理化学学报), 2004, 20(8): 864.
- [5] YAN Cheng-nong, ZHANG Hua-xin, LIU Yi, et al(颜承农, 张华新, 刘义, 等). Acta Chim. Sin.(化学学报), 2005, 63(18): 1727.
- [6] Wang Yan-Qing, Zhang Hong-Mei, Zhang Gen-Cheng. J. Pharm. Biomed. Anal., 2006, 41(3): 1041.
- [7] YAN Zheng-yu, SHAO Xiu-fen, JIANG Xin-min, et al(严拯宇, 邵秀芬, 姜新民, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(8): 1494.
- [8] Lakowicz J R, Weber G. Biochemistry, 1973, 12(21): 4161.
- [9] MA Gui-bin, YANG Pin(马贵斌, 杨频). Chinese Biochemical Journal(生物化学杂志), 1992, 8(5): 624.
- [10] Ross P D, Subramanian S. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096.
- [11] YANG Pin, GAO Fei(杨频, 高飞). Principle of Bioinorganic Chemistry(生物无机化学原理). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2002. 322.
- [12] Cheng Fang-Qing, Wang Ya-Ping, Li Zhong-Ping, et al. Spectrochim. Acta A, 2006, 65(5): 1144.
- [13] BIAN He-dong, LI Mei, YU Qing, et al(边贺东, 李梅, 于青, 等). Chinese Journal of Inorganic Chemistry(无机化学学报), 2006, 22(5): 845.
- [14] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). Fluorescence Analytical Method(荧光分析方法). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990. 122.
- [15] 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.
- [16] Shaikh S M T, Seetharamappa J, Ashoka S, et al. Dyes and Pigments, 2007, 73(2): 211.
- [17] Pang Yue-Hong, Yang Li-Li, Shuang Shao-Min, et al. J. Photochem. Photobiol. B, 2005, 80(2): 139.

Studies on Interaction of Sinafloxacin with Bovine Serum Albumin and Effect of the Coexistent Metal Ions on the Reaction

FEI Yan¹, LU Guo-cai², FAN Guo-rong^{1*}, QI Yun-peng¹, WU Hui-ling¹, WU Yu-tian¹

1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical Metabolites Research, Shanghai 200433, China
2. Center for New Drug Evaluation, Institute of Basic Medical Science, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract Serum albumin is the most abundant protein in plasma. It can bind with many intrinsic and extrinsic materials. The study of the interaction between serum albumin and drugs is a very important task in life science and chemistry. Quinolone drug is a kind of antibacterial drugs which have been used widely in clinical medicine, but its pharmacology and toxicology still have to be studied further. Sinafloxacin is a new quinolone antibiotics. The interaction between sinafloxacin and bovine serum albumin (BSA) at different temperatures and pH was investigated by fluorescence and UV absorption spectroscopy. The experimental results demonstrate that the fluorescence quenching of BSA by sinafloxacin is a result of the formation of sinafloxacin-BSA complex and the quenching mechanism is mainly static quenching. The interaction association constants of BSA and sinafloxacin were determined from the double reciprocal Lineweaver-Burk plot. The binding distance ($r=3.64$ nm) and energy transfer efficiency ($E=0.163$) between donor (BSA) and acceptor (sinafloxacin) were obtained based on Förster's non-radiative energy transfer theory. There is a strong interaction between sinafloxacin and BSA. From thermodynamic coordination it can be judged that the binding force between sinafloxacin and BSA is mainly electro-static force. The effect of sinafloxacin on the conformation of BSA was analyzed by synchronous fluorescence spectrometry and three-dimensional fluorescence spectrometry. The emission maximum of tyrosine residues does not show a significant shift, while the small blue shift of tryptophan residues indicates that the hydrophobicity of microenvironment was increased. In addition, in the plasma, there are some metal ions, which can participate in many important vital actions and affect the reactions of the drugs with the serum albumins. So the effect of Cu(II), Fe(III), Zn(II) and Mg(II) on the binding constant of sinafloxacin to BSA was also discussed and it was shown that the interaction between BSA and sinafloxacin was decreased. In short, the results offer a reference for the studies on the biological effects and action mechanism of sinafloxacin with albumins in vivo.

Keywords Sinafloxacin; Bovine serum albumin; Fluorescence; Energy transition

(Received Oct. 8, 2007; accepted Jan. 8, 2008)

* Corresponding author