

恩诺沙星与中华绒螯蟹血浆蛋白结合率的研究

黄鸿兵¹, 吴光红¹, 张静波², 陈颐³

(1. 江苏省淡水水产研究所, 江苏南京 210017; 2. 南京农业大学农业部农畜产品加工与质量控制重点开放实验室, 江苏南京 210095; 3. 盐城市产品质量监督检验所, 江苏盐城 224005)

摘要: 为探索养殖过程中恩诺沙星 (Enrofloxacin, ENR) 施用于中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 中的药效情况, 文章通过静置平衡透析法分析研究了恩诺沙星与中华绒螯蟹血浆的蛋白结合率。试验测得的中华绒螯蟹血浆蛋白浓度为 $63.95 \pm 0.29 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 蛋白分子量主要集中在 66.2 ~ 97.1 kDa 之间, 恩诺沙星与中华绒螯蟹血浆蛋白的结合率在 47.39% ~ 82.58% 之间。分析结果认为, 恩诺沙星与中华绒螯蟹血浆 50% 以上的蛋白结合率, 在中华绒螯蟹养殖生产过程中需要慎重考虑恩诺沙星的有效药物浓度及其与其它药物的竞争作用, 以能充分发挥恩诺沙星的作用。

关键词: 恩诺沙星; 中华绒螯蟹; 血浆; 蛋白结合率

中图分类号: S948 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-2227-(2008)05-0023-05

Study on binding capacity of Enrofloxacin (ENR) with blood plasma protein of Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis*

HUANG Hongbing¹, WU Guanghong¹, ZHANG Jingbo², CHEN Yi³

(1. Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210017, China; 2. Key Lab. of Agriculture and Animal Products Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. Yancheng Institute of Supervision & Testing on Product Quality, Yancheng 224005, China)

Abstract: The binding capacity of the drug enrofloxacin with the plasma protein of Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* during feeding was investigated. The method of fixed equilibrium dialysis test was applied to the study on the binding of enrofloxacin with the crab blood plasma protein. Concentration of the plasma proteins in Chinese mitten-handed crab was $63.95 \pm 0.29 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Molecular weight of these proteins were mainly between 66.2 ~ 97.1 kDa. Protein binding level of enrofloxacin and crab plasma proteins was 47.39% ~ 82.58%, showing that more than 50% of the drug could be bound to the proteins. Thus, it could be concluded that enrofloxacin can bind with plasma proteins tightly. So, in case of using enrofloxacin alone or with other medicine, its effective concentration and competition between drugs should be considered in Chinese mitten-handed crab culture.

Key words: Enrofloxacin; Chinese mitten-handed crab; *Eriocheir sinensis*; plasma; protein binding

大多数药物在体内的药理作用是药物与特异受体作用的结果。药物吸收入血后会不同程度地与血浆蛋白结合, 按其与血浆蛋白结合与否分为结合型和游离型。这是一个迅速、可逆的过程, 很快达到

收稿日期: 2008-02-22; 修回日期: 2008-07-29

资助项目: 江苏省省级海洋渔业开发项目 (2007); 江苏省水产三项工程项目 (PJ2005-51)

作者简介: 黄鸿兵 (1979-), 男, 研究实习员, 从事水产品加工与质量安全研究, E-mail: nanjingrice@yahoo.com.cn

通讯作者: 吴光红, E-mail: wuguangh@jlonline.com

动态平衡^[1]，游离药物 + 血浆蛋白 \rightleftharpoons 药物-血浆蛋白结合物。因而，药物与血浆蛋白的结合率是影响药效的重要因素之一^[2]。

喹诺酮类药物是一类广谱、高效、低毒的抗菌药，具有良好的药物动力学特性。恩诺沙星对革兰氏阳性菌及阴性菌引起的细菌感染均有较强的抑杀作用。主要用于预防和治疗由嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*、温和气单胞菌 *A. sobria*、鳗弧菌 *Vibrio anguillarum*、假单胞菌 *Pseudomonas* sp. 等引起的中华绒螯蟹病害黑鳃病、烂肢病、蟹奴病、颤抖病等疾病^[3]。目前，国内外学者已大量开展了药物与血浆蛋白的结合分析，他们广泛分析了药物与血浆蛋白的结合率、结合常数，血浆蛋白与药物结合位点数，结合反应热力学函数及模型等^[4-5]。这些研究为新药开发和应用提供了有力的理论和技术保障。ZLOTOS 等^[6]详细研究了恩诺沙星 (Enrofloxacin, ENR)、环丙沙星等 18 种喹诺酮类药物与牛血清蛋白、人血清蛋白、人血浆的蛋白结合率。学者们还对恩诺沙星^[7]、氧氟沙星^[8]、左氟沙星^[9]、洛美沙星^[10]、普利沙星^[11]、依诺沙星^[12]等喹诺酮类药物与蛋白的相互作用进行了详细的光谱分析研究。贾丽华等^[13]研究了恩诺沙星与牛血清白蛋白的相互作用，得到两者的结合常数为 $4.16 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ，以其摩尔比 1:1 结合。

恩诺沙星与中华绒螯蟹 (Chinese mitten-handled crab, *Eriocheir sinensis*) 血浆蛋白的相互作用及结合率研究还未见报道，此文则通过静置平衡透析法研究了恩诺沙星与中华绒螯蟹血浆蛋白的结合率，旨在为恩诺沙星在中华绒螯蟹养殖生产过程中提供用药指导。

1 材料与方法

1.1 实验试剂及设备

恩诺沙星标准品 (>99.7%，美国 Sigma 公司出品)；甲醇 (色谱纯，德国 Riedel Haen 公司出品)；乙腈、磷酸、三乙胺 (色谱纯，美国 TEDIA 公司出品)；流动相用水 (18.2 MΩ)。

高速冷冻离心机 (美国贝克曼公司出品)；Waters2695 高效液相色谱仪 (美国 Water 公司出品)；超纯水仪 (美国 Millipore 公司出品)；透析袋 (进口分装，膜分子量 13 000 kDa，直径 21 mm)。

1.2 样品制备

恩诺沙星溶液配制。恩诺沙星用 Tris-HCl 缓冲液 (0.05 mol·L⁻¹，pH 7.4，内含 0.15 mol·L⁻¹ NaCl) 配制成 500.0 μg·mL⁻¹ 的标准品储备液，使用按需要浓度稀释。

中华绒螯蟹血浆制取。中华绒螯蟹从当地农贸市场购买，体重 200 g 左右，健康无疾病，从河蟹背部心区开一小孔，用注射器抽取血淋巴，每只蟹 0.5 mL，混合后移入装有 0.5 mL ACD 抗凝剂的 eppendorf 管中，离心后得河蟹血浆。

ACD 抗凝剂配方为柠檬酸三钠 1.32 g，柠檬酸 0.44 g，无水葡萄糖 1.47 g，溶解 70~80 mL 蒸馏水中，再加入 0.1~0.2 g 活性炭，静置 10 min 后过滤即得。

1.3 恩诺沙星浓度测定

药物浓度测定^[14]。吸取 0.5 mL 样品于 10 mL 离心管中，加入 5 mL 乙腈，旋涡混合 2 min，5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min，将上清液转移至旋转蒸发瓶中。往残渣中加入 5 mL 乙腈，重复上述操作。旋转蒸发后，准确加入 1 mL 流动相溶解残留物，过 0.22 μm 滤膜，待测。

色谱条件^[14]。色谱柱为 Zorbax SB-C18 分析柱 (250 mm × 4.6 mm i. d.，5 μm)；流动相为 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸溶液 (以三乙胺调 pH 至 2.4) / 乙腈 = 86/14 (V/V)；检测为荧光检测器；激发波长 280 nm，发射波长 455 nm；柱温 40℃；进样量 20 μL；流速 1 mL·min⁻¹。

标准曲线的绘制为准确配制 5、1、0.5、0.1、0.05 和 0.01 μg·mL⁻¹ 的 ENR 标准品工作液。以标样浓度为横坐标，HPLC 测得相应的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

回收率、精密度和检测限的测定为分别向 2.0 mL 空白样本中加入浓度为 0.2 μg·mL⁻¹ ENR 标准液 0.1、0.2、0.5 mL，添加水平分别为 10、20、50 μg·mL⁻¹ (n=6)，旋涡混匀，放置 15 min，然后再进行前处理及高效液相色谱分析，计算回收率和精密度。根据国际纯粹与应用化学联合会 (IUPAC) 的定义，此法的检测限定义为产生相当于 3 倍背景噪音的标准偏差分析信号的浓度值^[15]。

1.4 蛋白结合率透析实验

采用平衡透析法^[16]。将药物加至 Tris-HCl 缓

冲液 ($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4, 内含 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl) 中, 浓度分别为 0.2, 0.4, 1.0, $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。透析袋中装河蟹新鲜血浆 2.0 mL, 袋口扎紧, 保证不漏, 放入 30 mL 广口玻瓶中, 每瓶加 10 mL 不同浓度药物的缓冲液。透析于 4℃ 冷柜中进行; 空白处理为透析袋外是 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 恩诺沙星溶液, 透析袋内是 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 缓冲液, 分别于静置平衡透析 48、72、96 h 时取透析袋内血浆样品 0.5 mL 和透析袋外缓冲溶液样品 0.5 mL, 测定其中的药物浓度, 确定是否达到平衡时间 (平衡时间点以空白处理组透析袋内外浓度相等确定) 后, 以前述血浆处理方法测定药物浓度。根据以下公式计算血浆蛋白结合率。

$$\text{血浆蛋白结合率} = (\text{血浆药物浓度} - \text{透析液药物浓度}) \times 100\% / \text{血浆药物浓度}$$

1.5 中华绒螯蟹血淋巴电泳实验

取中华绒螯蟹血浆, 制备成 5、10、20 倍的稀释液。电泳方法参考汪家政和范明^[17]的方法, 采用 Bio-Rad 公司 Mini-protean II 电泳仪; 丙烯酰胺在浓缩胶中的百分比 4%, 分离胶中的百分比 12.5%; 浓缩胶聚合时间 0.5 h, 分离胶聚合时间 1 h; 浓缩胶电泳电压 120 V, 时间 30 min; 分离胶电泳电压 80 V, 时间 3 h 15 min; 0.1% 考马斯亮蓝 R-250 染色, 染色时间 15 min; 脱色过夜, 次日拍取照片。

1.6 统计分析

此试验每个参数做 3 个重复 (中华绒螯蟹血浆混合后重复做 3 次), 取其平均值, 采用 Excel 2003 统计分析实验参数, 并用 SAS 8.2 进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 恩诺沙星标准曲线、回收率、相对标准偏差

以标准样品浓度为 X , 以 HPLC 测得相应的峰面积为 Y , 求出 ENR 的回归方程是 $Y = 124.254X + 0.161$, 相关性系数是 0.99999。结果表明, ENR 在 $0.01 \sim 5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性良好, 可以满足定量分析的需要。

添加 ENR 10、20 和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 时, 回收率为 85% [相对标准偏差 (RSD) 为 7%]、86%

(RSD 为 3%)、82% (RSD 为 5%)。据定义得出 ENR 的检测限低于 $1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。方法的准确度和精密度均符合残留分析的要求。

2.2 透析平衡时间确定

由图 1 可得, 4℃ 条件下, 静置透析到 48 h 后时, 透析袋内浓度为透析袋外浓度的 105.37%、95.85% 和 101.48%, 各时间测得的平衡率之间差异不显著 ($P > 0.05$), 能较好体现透析袋内外的浓度平衡。所以, 蛋白结合率实验部分取样时间主要为 48、72、96 h。

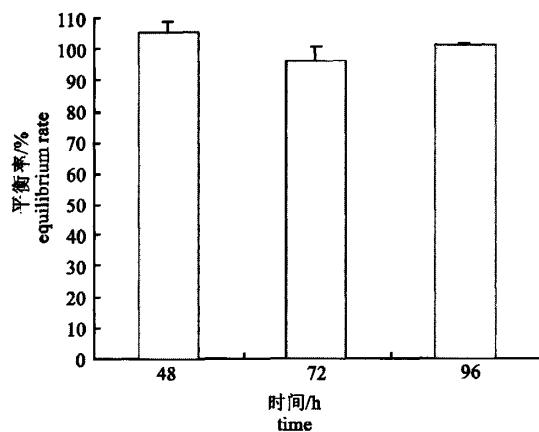


图 1 不同透析时间下恩诺沙星 ($1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的透析平衡程度

Fig. 1 Equilibrium rate of enrofloxacin solution at different dialysis time

2.3 恩诺沙星与中华绒螯蟹血浆蛋白结合率的研究

表 1 显示恩诺沙星与中华绒螯蟹血浆蛋白结合率分布在 47.39% ~ 82.58% 之间。透析时间 48 和 72 h 时, 结合率随着恩诺沙星浓度的增大有减小的趋势, 但在透析 96 h 时, 各浓度间差异不明显。恩诺沙星浓度 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 透析 96 h 时, 结合率显著小于其它透析时间的结合率。其它浓度条件下, 结合率随透析时间不发生显著变化 ($P > 0.05$)。

2.4 中华绒螯蟹血浆蛋白组分的研究

通过测定中华绒螯蟹血浆在 280 nm 处的紫外光密度可计算得, 试验中中华绒螯蟹血浆蛋白浓度为 $63.95 \pm 0.29 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。从电泳图谱 (图 2) 可知, 中华绒螯蟹血浆蛋白的分子量主要集中在 66.2

表1 恩诺沙星与中华绒螯蟹血浆蛋白的结合率

Tab. 1 Binding of ENR with plasma protein in *E. sinensis*

结合率/% protein bind data	透析袋外药物初始浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($n=3$) concentration of drug outside dialysis bag			
	0.2	0.4	1.0	5.0
透析时间 dialysis time	83.84	78.55	65.679	49.222
	83.33	68.17	59.272	48.974
	80.58	65.70	54.095	43.971
	平均值 \pm 标准差	82.58 ± 1.75^a	70.81 ± 6.82	59.68 ± 5.80
		82.68	69.26	57.524
	72 h	84.29	67.76	52.303
透析时间 dialysis time	80.14	72.43	59.662	54.295
	平均值 \pm 标准差	82.37 ± 2.09^a	69.82 ± 2.38	56.50 ± 3.79
		72.41	67.11	62.742
	96 h	69.67	59.39	60.765
	62.22	61.41	63.939	49.021
	平均值 \pm 标准差	68.10 ± 3.93^b	62.64 ± 1.64	62.48 ± 1.59
				52.94 ± 2.09

注: 表格中字母相同表示同一浓度, 不同时间之间差异不显著, 显著性水平 $P > 0.05$

Note: Same superscript letters mean no difference in the same row, otherwise, significant difference, $P > 0.05$.

~97.1 kDa 之间, 在 5 倍稀释泳道中可以看到在上述分子量范围以外的其它蛋白, 从最小的 10 kDa 左右到最大 100 kDa 左右不等。10 和 20 倍稀释液电泳后, 泳道中仅能看到 2 条分子量 66.2 ~ 97.1 kDa 之间的蛋白, 其它蛋白则由于浓度过稀而观察不到。

3 讨论

(1) 血浆中与药物结合的主要蛋白是血清白蛋白 (分子量 66 000 kDa 左右)^[1,18]。中华绒螯蟹血浆蛋白分子量主要在 66.2 ~ 97.1 kDa 之间。试验中采用的透析膜 (截留分子量 13 kDa) 能达到阻止蛋白进出, 保证恩诺沙星 (分子量 359.4 g·mol⁻¹) 和水在透析袋内外的自由迁移。

(2) 平衡透析法是结合率分析的传统方法, 比较可靠和经济实用。ZLOTOS 等^[6]研究发现药物/蛋白物质的量浓度比例 0.01 条件下, 恩诺沙星与人血清蛋白 (HSA) 结合率为 (34.6 \pm 5.6)% (连续超滤法) 和 (40 \pm 2)% (不连续超滤法)。KAARTINEN 等^[19]研究发现恩诺沙星与奶山羊血浆蛋白的结合率为 36% ~ 45% (体外实验)。此试验得到的结合率结果高于文献中蛋白结合率的主要原因: ①血清蛋白的活性。OLSEN 等^[20]研究发现血清蛋白结合稳定剂后与药物的蛋白结合率大幅提

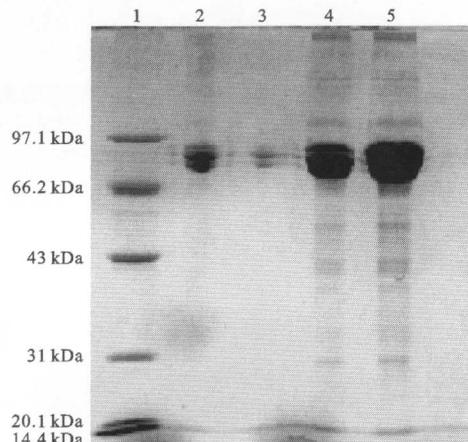


图2 中华绒螯蟹血浆蛋白电泳图谱

1. 标准蛋白; 2. 10 倍稀释血浆; 3. 20 倍稀释血浆; 4 ~ 5. 5 倍稀释血浆

Fig. 2 Electrophoretic figure of plasma protein in *E. sinensis*

1. standard proteins; 2. plasma ($\times 10$); 3. plasma ($\times 20$);

4 ~ 5. plasma ($\times 5$) .

高。②药物浓度与蛋白浓度的比例。此试验所用的药物/蛋白物质的量比例约在 0.002 ~ 0.05 之间, 符合实际生产中的用药情况, 在该浓度下, 血浆蛋白只有一个位点会与药物发生结合作用。试验中的结合率数据主要分布在 47.39% ~ 70.81%, 而出现的 82.58% 和 82.37% 2 个高数值, 可能是因

为药物数量偏少, 蛋白充分结合的结果; 随着取样次数的增多, 蛋白数量减少要多于药物数量, 结合率趋于稳定。③结合率测定方法上的差异。更快捷的连续超滤法、表面响应传感器等方法与此试验所得的结合率结果有一定的一致性, 结果差异来自仪器、透析膜对药物的吸附等多方面。

(3) 已有一些恩诺沙星在中华绒螯蟹体内的药物动力学研究见于报道^[14]。此试验针对恩诺沙星与中华绒螯蟹血浆蛋白结合率开展的研究发现, 结合率主要在 47.39% ~ 82.58% 之间, 试验要高于恩诺沙星与其它畜禽类血浆蛋白的结合率 20% ~ 50%。恩诺沙星与犬血浆蛋白的结合率仅有 27% 左右^[21]。原因可能是: ①中华绒螯蟹血浆中蛋白浓度较高, 蛋白种类比较丰富, 除血清蛋白外, 还有其它可能与恩诺沙星结合的蛋白, 这会增大恩诺沙星与血浆蛋白的结合率; ②文献使用的是试剂级血清白蛋白, 而血浆则是新鲜制取所得, 两者活性上存在一定的差异^[20]。

药物与血浆蛋白结合率过高和过低都不利于药效的发挥^[22]。药物可以通过与血浆蛋白结合而被带到作用点, 然后解离成游离态发挥药效。此试验发现恩诺沙星与中华绒螯蟹血浆蛋白有 50% 以上的结合率。用药初始阶段, 恩诺沙星会较多与血浆蛋白结合, 因而实际游离态的药物浓度要低于用药浓度, 药效会偏低; 从另一个角度来看, 游离态药物代谢以后, 结合态恩诺沙星的释放又会使药物的药效时间延长。因此, 在实际生产过程中, 需要综合考虑药物的有效浓度、药效时间, 必要情况下要考虑与其它药物的搭配使用, 达到有效治疗的目的。

参考文献:

- [1] 曾经泽. 生物药物分析 [M]. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1998.
- [2] 赵燕燕, 杨更亮, 李海鹰, 等. 高效前沿分析的发展及在药物-蛋白结合研究中的应用 [J]. 化学通报, 2003, 66 (5): 327 ~ 332.
- [3] 刘开永, 汪开毓. 恩诺沙星在水产中的应用与研究 [J]. 中国兽药杂志, 2004, 38 (10): 32 ~ 34.
- [4] ASHOKA S, SEETHARAMAPPA J, KANDAGAL P B, et al. Investigation of the interaction between trazodone hydrochloride and bovine serum albumin [J]. J Luminescence, 2006, 121 (1): 179 ~ 186.
- [5] TIAN Jianniao, LIU Jiajin, HU Zhide, et al. Interaction of wogonin with bovine serum albumin [J]. Bioorganic Medicinal Chem, 2005, 13 (12): 4124 ~ 4129.
- [6] ZLOTOS G, OEHLMANN M, NICKELE P, et al. Determination of protein binding of gyrase inhibitors by means of continuous ultrafiltration [J]. J Pharm Biomed Anal, 1998, 18 (4/5): 847 ~ 858.
- [7] ELMAS M, YAZAR E, TRAS B, et al. Pharmacokinetics and oral bioavailability of enrofloxacin in faunated and defaunated angora goats [J]. Rev Med Vet, 2000, 151 (6): 507 ~ 510.
- [8] 赵长春, 郑维发, 王锦化, 等. 国产氧氟沙星与人血清白蛋白的相互作用 [J]. 中国药学杂志, 2003, 38 (10): 791 ~ 793.
- [9] 易帅, 吴军, 郭明, 等. 氧氟沙星和左氟沙星与人牛血清白蛋白的相互作用研究 [J]. 浙江大学学报: 理学版, 2004, 31 (3): 314 ~ 318.
- [10] 何华, 叶海英, 戴丽, 等. 洛美沙星-Tb~(3+)配合物与 BSA 相互作用的荧光光谱研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 3 (3): 480 ~ 483.
- [11] 陈昌云, 李小华, 许飞, 等. 普利沙星与牛血清白蛋白相互作用的光谱学研究 [J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2006, 29 (1): 62 ~ 65.
- [12] 刘永明, 李桂芝. 荧光猝灭法研究依诺沙星和蛋白质的相互作用 [J]. 应用化学, 2004, 21 (6): 621 ~ 624.
- [13] 贾丽华, 曾晓丹, 郭祥峰. 恩诺沙星与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. 应用化学, 2006, 23 (9): 957 ~ 960.
- [14] WU Guanghong, MENG Yong, ZHU Xiaohua, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in the Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* [J]. Anal Biochem, 2006, 358 (1): 25 ~ 30.
- [15] 杜进祥. 分析化学中的检出限、测定限与检测限 [J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 2003, 21 (6): 349 ~ 350.
- [16] 万丽丽. 野黄芩动物药代动力学研究 [D]. 上海: 上海医药工业研究院, 2005.
- [17] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学技术出版社, 2000.
- [18] 吴澄清. 药物与血浆蛋白结合对体内过程的影响 [J]. 中国药学杂志, 1998, 8 (2): 69 ~ 71.
- [19] KAARTINEN L, SOLONEN M, ALLI L, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows [J]. J Vet Pharm Therap, 1995, 18 (5): 357 ~ 362.
- [20] OLSEN H, ANDERSON A, NORDBØ A, et al. Pharmaceutical-grade albumin impaired drug-binding capacity in vitro [J]. BMC Clin Pharm, 2004, 4: 4.
- [21] 朱模忠. 兽药手册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [22] 汪庆海. 药物与血浆蛋白结合对分布的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 1985, 5 (2): 12 ~ 14.