

# 蛋白质保护的金纳米簇为荧光探针 检测甲磺酸帕珠沙星

胥彦琪

(江西医学高等专科学校药理学系,江西 上饶 334000)

**摘要:**基于牛血清白蛋白(BSA)保护的金纳米簇为荧光探针,通过甲磺酸帕珠沙星(PZFX)对其荧光的淬灭实现对PZFX的高灵敏度以及高选择性检测,检测限达 $2.9 \times 10^{-8}$  g/mL。并将此方法用于人尿液样品中PZFX检测,检测结果表明,该方法具有简单、高效、灵敏度高和实用性强等特点,具有较好的应用前景。

**关键词:**基于牛血清白蛋白;金纳米簇;甲磺酸帕珠沙星;尿液样品

**中图分类号:** O655

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0253-4320(2017)09-0203-03

**DOI:** 10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2017.09.048

## Detection of pazufloxacin mesylate by protein-protected gold nanoclusters

XU Yan-qi

(School of Biological Pharmaceutical Technology, Jiangxi Medical College, Shangrao 334000, China)

**Abstract:** Gold nanoclusters protected by bovine serum albumin is used as fluorescent probe, pazufloxacin mesylate (PZFX) is detected with high sensitivity and high selectivity through PZFX's quenching against fluorescent. The detection limit reaches  $2.9 \times 10^{-8}$  g·mL<sup>-1</sup>. This method is also used to detect urine samples. The results indicate that this method has good application prospect with characters of simple, efficient, high sensitivity and strong practicability.

**Key words:** bovine serum albumin; gold nanoclusters; pazufloxacin mesylate; urine samples

甲磺酸帕珠沙星(Pazufloxacin mesylate, PZFX)

属于第4代喹诺酮类抗菌药物<sup>[1]</sup>。用于治疗革兰氏阳性菌和阴性菌感染,如支气管及肺部感染、细菌性痢疾、泌尿系统、皮肤和软组织等,并且效果明显优于诺氟沙星、氧氟沙星、氟罗沙星等。临床试验研究表明,PZFX具有高效低毒、口服效果好等特性,其抗菌范围与交叉耐药性显著<sup>[2]</sup>。目前对PZFX的测定常用荧光法<sup>[3]</sup>、电泳法<sup>[4-5]</sup>、电化学法<sup>[6-7]</sup>、高效液相色谱法(HPLC)<sup>[8-9]</sup>等,这些方法虽灵敏可靠,但仪器昂贵,操作繁琐。

笔者以牛血清白蛋白(BSA)为保护剂,制备了一种荧光金纳米簇,其化学性质稳定并且在510 nm的激发波长下,在610 nm处具有明显的荧光发射峰,基于PZFX对其荧光的淬灭作用,实现对PZFX的快速灵敏检测。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA),分析纯,阿拉丁试剂有限公司生产;氯金酸(HAuCl<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O),分析纯, Sigma-Aldrich 公司生产;甲磺酸帕珠沙星(Pazufloxacin mesylate, PZFX),分析纯,国药

集团化学试剂有限公司生产。

Lambda 35 紫外-可见分光光度计,美国 Perkin-Elmer 公司生产;RF-5301pc 荧光分光光度计,日本岛津公司生产;CJJ-781C 型恒磁力搅拌器;AB204-N 电子分析天平;KQ-50 型超声清洗器。

### 1.2 BSA-AuNCs 金纳米簇的制备

根据文献[10],在37℃下向10 mL 50 mg/mL的牛血清蛋白溶液中加入10 mL 10 mmol/L 氯金酸溶液,充分反应2 min后,加入1 mL 1 mol/L的NaOH溶液后,在37℃水浴中连续搅拌12 h。BSA修饰的金纳米簇(BSA-AuNCs)为棕色溶液,将所制备的金纳米簇置于冰箱(4℃)避光储存备用。

### 1.3 PZFX 对 BSA-AuNCs 溶液荧光强度的影响

分别取20 μL质量浓度 $1.5 \times 10^{-2} \sim 1.5 \times 10^{-6}$  g/mL的PZFX,分别加入到1 mL的BSA-AuNCs溶液中,在510 nm的激发波长下,测其610 nm处的发射峰的荧光强度的变化。

### 1.4 干扰物质对 BSA-AuNCs 荧光强度的影响

分别取20 μL质量浓度为1 mg/mL的干扰物质:天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、亮氨酸(Leu)、半胱氨酸(cys)、尿素(Urea),分别加入到1 mL BSA-AuNCs溶液中,以及20 μL质量浓度为1 mg/mL的

K<sup>+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup> 分别加入到 1 mL BSA-AuNCs 溶液中,充分反应后测其荧光强度值。

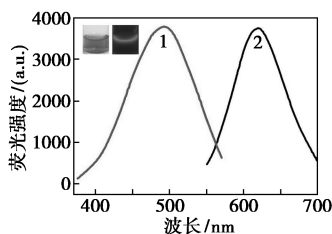
### 1.5 实际样品检测

分别取 4 份健康志愿者尿液样品进行过滤处理,之后分别加入 150、180、250、300 g/mL 的 PZFX 溶液。混合均匀后,分别取 20 μL 加入到 1 mL BSA-AuNCs 溶液中,充分反应后测其荧光强度值,根据标准曲线计算每份样品中 PZFX 的质量浓度,并与标准进行比对。

## 2 结果与讨论

### 2.1 金纳米簇的表征

在可见光下,BSA 修饰的金纳米簇呈红棕色,而在 365 nm 紫外光照射下,溶液呈现出明显的红色荧光。之后通过荧光分光光度计检测,在 510 nm 出现最大激发波长,在 610 nm 处出现最强发射峰,如图 1 所示。由图 1 可以看出,BSA-AuNCs 的激发峰与发射峰具有很好的峰型对称性,具有较好的荧光性能<sup>[11]</sup>。金纳米簇紫外吸收光谱图如图 2 所示。由图 2 可以看出,BSA 溶液在 285 nm 处有明显的吸收峰<sup>[12]</sup>,而在 400 nm 之后,并没有出现明显的表面等离子吸收峰,根据文献<sup>[13-14]</sup>中所述,合成的 2 种金纳米簇粒径均小于 2 nm<sup>[15]</sup>。



1—激发光谱;2—发射光谱

图 1 BSA-AuNCs 的荧光光谱

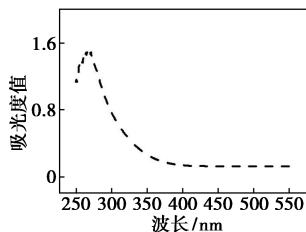
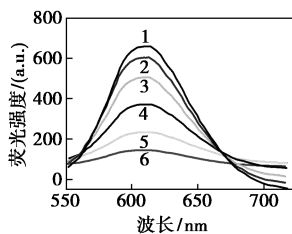


图 2 BSA-AuNCs 紫外吸光谱图

### 2.2 PZFX 的检测

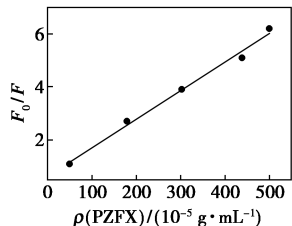
不同质量浓度 PZFX 对 BSA-AuNCs 荧光强度的影响以及检测线性关系如图 3 所示。由图 3 可以看出,BSA-AuNCs 在 520 nm 的激发波长下,在 610

nm 处有明显的发射峰。分别取 20 mL 质量浓度为  $1.5 \times 10^{-2} \sim 1.5 \times 10^{-6}$  g/mL 的 PZFX 加入到 1 mL 的 BSA-AuNCs 溶液中,在 510 nm 的激发波长下,测其 610 nm 处的发射峰的荧光强度的变化,检测限达  $2.9 \times 10^{-8}$  g/mL。当 PZFX 的质量浓度为  $50 \times 10^{-5} \sim 500 \times 10^{-5}$  g/mL 时,与荧光强度的改变 ( $F_0/F$ ) 具有明显的线性关系。 $R^2 = 0.996 23$ ,线性关系为  $F_0/F = 0.627 29 + 0.010 79c$ 。BSA-AuNCs 的荧光强度随着 PZFX 质量浓度的增大而逐渐减弱,直至淬灭,说明 PZFX 与 BSA-AuNCs 之间发生很强的相互作用。BSA 通过 Au-SH 键与金纳米簇相连,其作为稳定剂包裹在纳米颗粒的表面,如果 BSA 的结构遭到了破坏,那么金纳米簇的荧光强度就会受到影响<sup>[16]</sup>。有文献指出<sup>[17]</sup>,PZFX 可以通过改变 HSA 上的色氨酸的构型而发生强烈的相互作用。由此可以推测,PZFX 导致的 BSA-AuNCs 荧光的淬灭是由于改变了 BSA 中的色氨酸构象所导致的,如图 4 所示。由图 4 可以看出,在 280 nm 的激发光下,在 348 nm 处出现发射峰,而在此激发波长下,BSA-AuNCs 的发射峰发生了蓝移,位于 340 nm 处。之后再向 BSA-AuNCs 中加入 PZFX 后,吸收峰继续蓝移,并且在 378 nm 处出现 PZFX 的发射峰,从荧光峰位及强度的变化上说明 BSA 的构型发生了很大的变化。



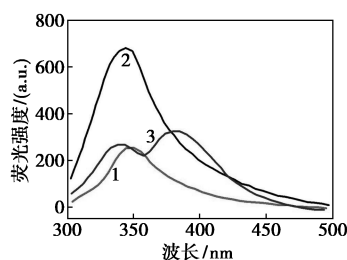
1—BSA-AuNCs;2—BSA-AuNCs+ $1.5 \times 10^{-6}$  g/mL PZFX;  
3—BSA-AuNCs+ $1.5 \times 10^{-5}$  g/mL PZFX;  
4—BSA-AuNCs+ $1.5 \times 10^{-4}$  g/mL PZFX;  
5—BSA-AuNCs+ $1.5 \times 10^{-3}$  g/mL PZFX;  
6—BSA-AuNCs+ $1.5 \times 10^{-2}$  g/mL PZFX

(a) PZFX 检测荧光光谱图



(b) PZFX 检测标准曲线

图 3 不同质量浓度 PZFX 对 BSA-AuNCs 荧光强度的影响以及检测线性关系图



1—BSA; 2—BSA-AuNCs; 3—BSA-AuNCs+PZFX

图4 BSA、BSA-AuNCs 以及向 BSA-AuNCs 中加入 PZFX 后的荧光光谱图 ( $EX = 280 \text{ nm}$ )

### 2.3 干扰物质检测

为了确定对 PZFX 检测选择性,选取天冬氨酸 (Asp)、谷氨酸 (Glu)、亮氨酸 (Leu)、半胱氨酸 (cys)、尿素 (Urea) 以及  $K^+$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Na^+$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  作为干扰物质。检测结果如表 1 所示,只有当溶液中存在 PZFX 时,荧光强度会发生明显的下降,而其他物质对 BSA-AuNCs 体系的荧光强度都没有太大的影响,表明 BSA-AuNCs 对 PZFX 具有良好的选择性。

表 1 干扰例子检测

样品	PZFX	Asp	Glu	Leu	Cys	Urea	$K^+$
荧光强度	20	306	313	289	314	317	378
样品	$Na^+$	$Co^{2+}$	$Zn^{2+}$	$Cd^{2+}$	$Mg^{2+}$	$Fe^{3+}$	$Ni^{2+}$
荧光强度	349	352	339	376	371	350	334

### 2.4 标准样品检测

人体口服 PZFX 并经胃肠道吸收后,主要以尿液的形式排出。通过标准加入法对健康人的尿液进行了检测。结果表明,健康人的尿液中不含有 PZFX,而向健康人的尿液中加入 PZFX 后,检测均呈阳性。根据标准曲线计算每份样品中 PZFX 的质量浓度,检测结果如表 2 所示。

表 2 尿液样品检测

样品	标准加入质量浓度/ ( $g \cdot mL^{-1}$ )	检测值/ ( $g \cdot mL^{-1}$ )	回收率/%
1	0	0	ND
2	150	143	96.5
3	180	192	103.2
4	250	239	95.8
5	300	314	104.7

## 3 结论

基于甲磺酸帕珠沙星 (PZFX) 对 BSA 修饰的金纳米簇的荧光的淬灭,实现了对 PZFX 的灵敏检测,检测限达  $2.9 \times 10^{-8} \text{ g/mL}$ 。在质量浓度为  $50 \times 10^{-5} \sim 500 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$  时,与荧光强度的改变 ( $F_0/F$ ) 具有

良好的线性关系。并且通过标准加入法实现了对人尿液样品的检测,该方法具有简单、高效、灵敏度高、实用性强等特点,具有较好的应用前景。

### 参考文献

- [1] Carlucci G. Analysis of fluoroquinolones in biological fluids by high-performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 812(1/2): 343-369.
- [2] 钟倩. 抗菌药甲磺酸帕珠沙星 [J]. *世界临床药物*, 2004, 25(2): 122-123.
- [3] Phapale B P, Lee H W, Kim S D, et al. Analysis of pazufloxacin mesilate in human plasma and urine by LC with fluorescence and UV detection, and its application to pharmacokinetic study [J]. *Chromatographia*, 2010, 71: 101-106.
- [4] Li Q, Wang R, Pei F. Determination of pazufloxacin mesilate in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography [J]. *Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2004, 4(4): 289-293.
- [5] Zhang Z L, Li J J, Qu L B, et al. Determination of pazufloxacin mesylate by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2008, 36(7): 941-946.
- [6] Wang Y, Baeyens W R C, HUANG C, et al. Enhanced separation of seven quinolones by capillary electrophoresis with silica nanoparticles as additive [J]. *Talanta*, 2009, 77: 1667-1674.
- [7] Chen S L, Ma H W, Zhao H C, et al. Terbium-sensitized fluorescence method for the determination of pazufloxacin mesilate and its application [J]. *Analytical Sciences*, 2004, 20: 1075-1078.
- [8] Wang X L, Chen S L, Zhao H C, et al. Europium sensitized chemiluminescence determination of pazufloxacin mesylate in urine and serum [J]. *Analytical Letters*, 2005, 38(6): 971-979.
- [9] Yang C Y, Zhang Z J, Chen S, et al. Molecularly imprinted on-line solid-phase extraction combined with chemiluminescence for the determination of pazufloxacin mesilate [J]. *Microchimica Acta*, 2007, 159: 299-304.
- [10] Xie J P, Zheng Y G, Ying J Y. Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(3): 888-889.
- [10] Xie J P, Zheng Y G, Ying J Y. Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(3): 888-889.
- [11] Kawasak H, Yoshimura K, Hamaguchi K, et al. Trypsin-stabilized fluorescent gold nanocluster for sensitive and selective  $Hg^{2+}$  detection [J]. *Analytical Sciences*, 2011, 27(6): 591-596.
- [12] Aquila A, Murray R W. Monolayer-protected clusters with fluorescent dansyl ligands [J]. *Langmuir*, 2000, 16: 5949-5954.
- [13] Guével X L, Daum N, Schneider M. Synthesis and characterization of human transferrin-stabilized gold nanoclusters [J]. *Nanotechnology*, 2011, 22(27): 275103.
- [14] Xavier P L, Chaudhari K, Verma P K, et al. Luminescent quantum clusters of gold in transferrin family protein, lactoferrin exhibiting FRET [J]. *Nanoscale*, 2010, 2(12): 2769-2776.
- [15] Kawasak H, Hamaguchi K, Osaka I, et al. pH-dependent synthesis of pepsin-mediated gold nanoclusters with blue green and red fluorescent emission [J]. *Advanced Functional Materials*, 2011, 21(18): 3508-3515.
- [16] Zhang M, Dang Y Q, Li H W, et al. Pressure-induced fluorescence enhancement of the BSA-protected gold nanoclusters and the corresponding conformational changes of protein [J]. *The Journal of Physical Chemistry*, 2013, 117(1): 639-647.
- [17] Jin J, Zhang X. Spectrophotometric studies on the interaction between pazufloxacin mesilate and human serum albumin or lysozyme [J]. *Journal of Luminescence*, 2008, 128: 81-86. ■