



Biophysical Study on the Interaction of Ropivacaine with Human Serum Albumin Using Spectroscopic Methods

Kaiyan WANG¹ §, Jinpeng YAO² §, Zhi LI³, Yulin ZHU¹, Wei SHAO¹ & Lingzhi YU⁴ *

¹ Department of Anesthesiology, Yantaishan Hospital, Yantai 264000, People's Republic of China

² Hospital of Yantai Economic and Technological Development Area,
Yantai 264006, People's Republic of China

³ Department of Anesthesiology, Yantai Yuhuangding Hospital, Affiliated Hospital of Medical College,
Qingdao University, Yantai 264000, People's Republic of China

⁴ Jinan Central Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250013, People's Republic of China

SUMMARY. In this study, the interaction of human serum albumin (HSA) with ropivacaine was investigated by UV-vis, fluorescence, synchronous fluorescence and circular dichroism (CD) spectroscopic methods. Experimental results confirmed the complex formation between HSA and ropivacaine molecules under physiological conditions. Ropivacaine quenched the intrinsic fluorescence spectrum of HSA by static quenching mechanism. The binding constant of this system was calculated as $5.49 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ at 298K. The stability of HSA-ropivacaine complex illustrated a decrease within increasing temperature. The number of binding sites was found to be 1. Thermodynamic parameter values were calculated by using van't Hoff equation. According to sign and magnitude of thermodynamic parameters ($\Delta H = -735 \text{ J mol}^{-1}$ and $\Delta S = 10.3 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), hydrogen bonding and hydrophobic forces were found as the effective interaction forces between HSA and ropivacaine molecules. Synchronous fluorescence and circular dichroism spectroscopic methods proved the alteration of secondary structure of HSA in the presence of ropivacaine. Fluorescent resonant energy transfer study proved the existence of energy transfer with a distance of 2.03 nm. Binding site study revealed that ropivacaine locates in the site I of HSA.

RESUMEN. En este estudio, la interacción de albúmina de suero humano (HSA) con ropivacaína fue investigado por métodos espectroscópicos tales como dicroísmo circular (CD), UV-vis, fluorescencia y fluorescencia sincrónica. Los resultados experimentales confirmaron la formación de complejos entre las moléculas de HSA y ropivacaína en condiciones fisiológicas. La ropivacaína inactivó el espectro de fluorescencia intrínseca de HSA por el mecanismo de atenuación estática. La constante de unión de este sistema se calculó como $5,49 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ a 298 K. La estabilidad del complejo HSA-ropivacaína ilustra una disminución en el aumento de la temperatura. El número de sitios de unión se encontró que era 1. Los valores de los parámetros termodinámicos se calcularon mediante el uso de la ecuación de van't Hoff. De acuerdo al signo y a la magnitud de los parámetros termodinámicos ($\Delta H = -735 \text{ J mol}^{-1}$ y $\Delta S = 10,3 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), los enlaces de hidrógeno y fuerzas hidrofóbicas se encontraron como las fuerzas de interacción eficaces entre moléculas de HSA y ropivacaína. La fluorescencia sincrónica y los métodos espectroscópicos de dicroísmo circular demostraron la alteración de la estructura secundaria de HSA en presencia de ropivacaína. El estudio de la transferencia de energía de resonancia fluorescente demostró la existencia de transferencia de energía, con una distancia de 2,03 nm. El estudio del sitio de unión reveló que la ropivacaína se localiza en el sitio I de la HSA.

KEYWORDS: binding property, ropivacaine, serum albumin, spectroscopy.

* Author to whom correspondence should be addressed. *E-mail:* dr_lingzhiyu@126.com

§ Both the authors contributed equally to this work and share the first coauthorship.