

紫外分光光度法测定曲札芪苷的解离常数*

徐雅贞¹, 杨兆祥², 张 伟[△]

(1. 昆明医科大学, 云南昆明 650500; 2. 昆明制药集团股份有限公司药物研究院, 云南昆明 650100)

[摘 要] 目的: 采用紫外分光光度法测定曲札芪苷的解离常数。方法: 将曲札芪苷溶于一系列 Britton - Robinson 缓冲溶液中, 并选择在曲札芪苷适合的波长处分别测定它们的吸光度并计算其 pK_a 值。结果: 以 319、325 和 330nm 作为分析波长, 计算出曲札芪苷一级电离常数 $pK_{a1} = 7.90$; 以 330、340 和 350nm 作为分析波长, 计算出曲札芪苷的二级电离常数 $pK_{a2} = 10.41$ 。结论: 该方法操作简单易行, 重现性良好。曲札芪苷离解常数测定结果对进一步研究曲札芪苷的提取分离、制剂研究及其在生物体内的吸收、分布和代谢过程具有重要的参考意义。

[关键词] 曲札芪苷; 紫外分光光度法; 解离常数

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1000—2723(2012)03—0043—04

曲札芪苷是从蓼科植物拉萨大黄 (*Rheum lhasense* A. J. Li et P. K. Hsiao) 的干燥根或根茎中提取出的有效成分之一。化学名为 3, 5, 3', 4' - 四羟基芪 - 3 - O - β - 葡萄糖苷, 属二苯乙烯类化合物。近年研究表明二苯乙烯类化合物具有抗氧化清除自由基^[1-2]、抗肿瘤^[3-5]、舒张血管^[6]、抑制动脉粥样硬化^[7]等生物活性。解离常数是药物的重要理化性质之一, 测定药物的解离常数可用于推测药物的溶解、溶出以及体内吸收、分布、代谢和排泄等方面的性质。从而为药物生产、制剂、贮存等提供重要信息^[8]。目前, 用于测定解离常数的方法有毛细管电泳法^[9]、电位滴定法^[10]、紫外可见分光光度法^[11]、高效液相色谱法^[12]等。本文采用紫外分光光度法测定了曲札芪苷的解离常数, 所得结果对进一步研究开发曲札芪苷有重要的参考价值。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药

日本岛津 UV - 2450 紫外/可见分光光度计, 梅特勒 - 托利多 FE20 型实验室 pH 计, sartorius cp 225D 型电子天平, 曲札芪苷 (批号: 20110308), 磷酸、硼酸、冰乙酸、氢氧化钠等试剂均为分析

纯, 实验用水为超纯水。

1.2 测定原理

有机弱酸弱碱性药物在介质中可以发生电离。以有机弱酸为例, 其电离可以简单地表示为:

$HB = H^+ + B^-$ 根据质量作用定律, 在稀溶液中: $K_a = \frac{[H^+][B^-]}{[HB]}$ 式中电离平衡常数 K_a 常用其负对数值 pK_a 表示。对上式等号两边取负对数, 得: $pK_a = pH + \lg \frac{[HB]}{[B^-]}$ [1] 式中 HB 为共轭

酸, B^- 为共轭碱。如果 HB 与 B^- 均有紫外吸收, 他们的紫外吸收光谱又有明显的差异, 就可以用分光光度法测定 pK_a 值。测定时, 可取待测药物, 配制 3 份浓度相等的溶液, 通过调节 pH 值, 使溶液 (1) 中的药物部分以 HB 的形式存在, 部分以 B^- 存在; 溶液 (2) 中的药物以 HB 的形式存在; 溶液 (3) 中的药物以 B^- 的形式存在; 设溶液 (1)、(2)、(3) 中药物的浓度分别为 C , 溶液 (1) 中 HB 的浓度为 C_{HB} , B^- 的浓度为 C_B 。 A 、 A_{HB} 、 A_B 分别为在一定波长处溶液 (1)、(2)、(3) 的吸收度。如果 HB 与 B^- 的紫外吸收均符合吸收定律, 那么:

* 收稿日期: 2011—10—17 修回日期: 2011—12—23

作者简介: 徐雅贞 (1985 ~), 女, 山西太原人, 在读硕士研究生, 主要从事药物分析的基础研究。△通讯作者: 张伟, E-mail: wzhangkm@sohu.com.

$$\frac{A-A_B}{A_{HB}-A}=\frac{(\varepsilon_{HB}C_{HB}-\varepsilon_B C_B)-\varepsilon_B C}{\varepsilon_{HB}C-(\varepsilon_{HB}C_{HB}+\varepsilon_B C_B)}=\frac{\varepsilon_{HB}C_{HB}-\varepsilon_B C_{HB}}{\varepsilon_{HB}C_B-\varepsilon_B C_B}=\frac{C_{HB}}{C_B}\frac{(\varepsilon_{HB}-\varepsilon_B)}{(\varepsilon_{HB}-\varepsilon_B)}=\frac{C_{HB}}{C_B}$$

将式 $\frac{C_{HB}}{C_B}=\frac{A-A_B}{A_{HB}-A}$ 代入 [1] 式则有计算公式 $pK_a=pH+\lg\frac{A-A_B}{A_{HB}-A}$ [2] 式。因此可按 [2] 式计算有机弱酸药物的 pK_a 值, [2] 式中 pH 为溶液 (1) 的 pH 值^[13]。

1.3 实验方法

精密称取曲札芪苷 62.6mg, 置 250mL 量瓶中, 量取 2mL 甲醇使完全溶解, 用水定容至刻度, 摇匀, 作为贮备液备用。向 100mL 磷酸、硼酸和醋酸 (浓度均为 0.04mol·L⁻¹) 的混合液中加入不同体积的 NaOH (浓度为 0.2mol·L⁻¹) 配制一系列不同 pH 值的 Britton - Robinson 缓冲溶液。准确量取 1mL 贮备液于 25mL 量瓶, 分别用不同 pH 值的缓冲溶液定容, 摇匀, 得到不同 pH 值的曲札芪苷溶液。室温下用 1cm 石英比色皿, 用相应 pH 值的缓冲液为空白对照, 于 200 ~ 500nm 波长范围内扫描, 选择合适波长处测定各 pH 值的曲札芪苷溶液的吸光度值, 根据吸光度的变化趋势, 利用公式计算曲札芪苷的 pK_a 值。

2 结果与讨论

2.1 测定波长的选择

曲札芪苷为有机弱酸, 具有 3 个酚羟基。由于其解离的能力不同, 在不同 pH 值的缓冲溶液中分子型和离子型的摩尔比不同, 从而导致紫外吸收曲线的差异 (见图 1、2)。一般选择分子型、离子型药物紫外吸收系数差异大, 吸收曲线比较平坦的波长作为测定波长, 并避开等吸收点。根据图 2 选择 319, 325, 330nm 为计算曲札芪苷一级解离常数的测定波长。

2.2 曲札芪苷一级电离常数的测定

曲札芪苷在 pH 1.81 ~ 8.61 缓冲溶液中的吸收曲线 (见图 1)

由图 1 可知, 当溶液 pH 1.81 ~ 7.01 时, 曲札芪苷的紫外吸收光谱一致, 可认为其仅以分子状态存在。溶液在 pH 7.10 ~ 8.43 时, 319nm 处的最大吸收峰随着 pH 的增大而逐渐降低, 紫外吸收曲线变化明显, 可认为其部分以分子状态存在, 部分以一级解离形式存在。在波长 319, 328, 339nm 处测定不同 pH 缓冲溶液中吸光度 (见表 1), 以曲

札芪苷在 pH 7.01, 7.10 ~ 8.43 和 8.61 分别为完全未解离、部分解离和完全解离状态, 根据公式 2 计算得到 pK_{a1} 为 7.90 (见表 1)。

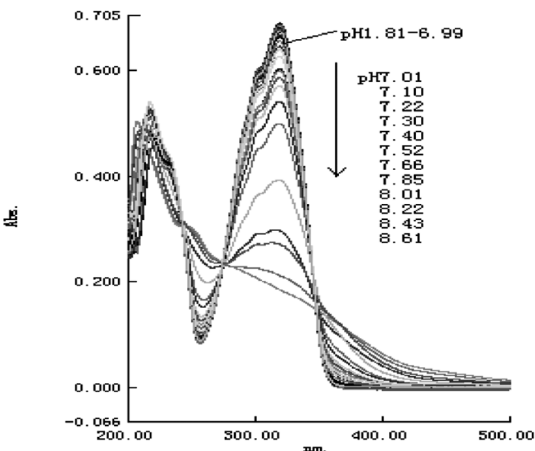


图 1 曲札芪苷在不同 pH 缓冲溶液中的紫外吸收光谱

表 1 曲札芪苷在 pH 7.10 ~ 8.43 缓冲溶液中的吸光度

pH	吸光度 A		
	319nm	325nm	330nm
7.01	0.641	0.607	0.536
7.10	0.603	0.572	0.504
7.22	0.599	0.569	0.503
7.30	0.587	0.557	0.494
7.40	0.571	0.543	0.482
7.52	0.541	0.515	0.461
7.66	0.500	0.477	0.429
7.85	0.392	0.378	0.349
8.01	0.296	0.285	0.266
8.22	0.271	0.262	0.250
8.43	0.211	0.205	0.199
8.61	0.184	0.178	0.173

表 2 曲札芪苷一级电离常数 pK_{a1} 的计算

pH	pK_{a1}			平均值
	319nm	325nm	330nm	
7.10	8.14	8.15	8.11	7.90
7.22	8.21	8.23	8.22	
7.30	8.17	8.18	8.18	
7.40	8.14	8.16	8.16	
7.52	8.07	8.08	8.10	
7.66	8.01	8.02	8.04	
7.85	7.77	7.79	7.82	
8.01	7.52	7.53	7.55	
8.22	7.59	7.61	7.65	
8.43	7.23	7.26	7.32	

2.3 曲札芪苷二级电离常数的测定

曲札芪苷在 pH 8.80 ~ 12.13 缓冲溶液中的吸收曲线（见图 2）

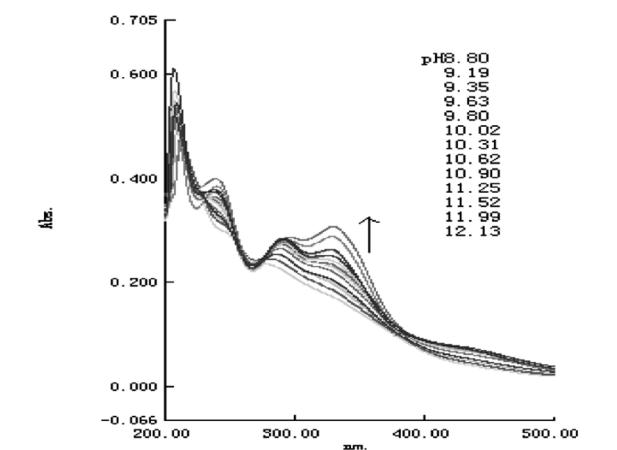


图 2 曲札芪苷在不同 pH 缓冲溶液中的紫外吸收光谱

由图 2 可知，在此 pH 条件下 290nm 和 330nm 处出现新的吸收峰，且随着 pH 升高，吸光度增强。在波长 330, 340, 350nm 处测定不同 pH 缓冲溶液中吸光度（见表 3），以曲札芪苷在 pH 8.80, 8.98 ~ 11.99 和 12.13 分别为完全未解离、部分解离和完全解离状态，根据公式 2 计算得到 pK_{a2} 为 10.41（见表 4）。

表 3 曲札芪苷在 pH 8.80 ~ 12.13 缓冲溶液中的吸光度

pH	吸光度 A		
	330nm	340nm	350nm
8.80	0.171	0.157	0.141
8.98	0.184	0.168	0.150
9.19	0.197	0.179	0.159
9.35	0.204	0.186	0.164
9.63	0.220	0.202	0.179
9.80	0.228	0.211	0.187
10.02	0.233	0.216	0.191
10.31	0.241	0.223	0.196
10.62	0.250	0.231	0.201
10.90	0.250	0.231	0.199
11.25	0.262	0.239	0.203
11.52	0.261	0.238	0.201
11.99	0.288	0.267	0.228
12.13	0.307	0.288	0.249

表 4 曲札芪苷二级电离常数 pK_{a2} 的计算

pH	pK_{a2}			平均值
	330nm	340nm	350nm	
8.98	9.96	10.02	10.02	10.41
9.19	9.82	9.89	9.89	
9.35	9.84	9.90	9.92	
9.63	9.88	9.91	9.90	
9.80	9.94	9.95	9.93	
10.02	10.10	10.11	10.08	
10.31	10.28	10.30	10.29	
10.62	10.48	10.51	10.52	
10.90	10.76	10.79	10.84	
11.25	10.94	11.03	11.12	
11.52	11.30	11.31	11.42	
11.99	11.24	11.27	11.37	

本方法测得曲札芪苷解离常数 pK_{a1} 和 pK_{a2} 分别为 7.90 和 10.41。

2.4 讨论

曲札芪苷为二苯乙烯苷类化合物，微溶于水。制备贮备液时先将其溶于少量甲醇中，再用水稀释定容。因甲醇含量很小，故与不含甲醇的水溶液相比对测定结果的影响可忽略。

本实验测得曲札芪苷有两个解离常数。其母体上虽具有 3 个羟基，但因位置不同解离强弱能力有所差别，又因酚羟基酸性较弱，不能逐个解离，所以只产生了二级解离。

3 结论

本文采用紫外分光光度法测定了曲札芪苷的解离常数，测得曲札芪苷的一级、二级解离常数分别为 7.90 和 10.41。该方法操作简单易行，重现性良好。研究结果对进一步研究曲札芪苷的提取分离、制剂研究及其在生物体内的吸收、分布和代谢过程具有重要的参考意义。

【参考文献】

[1] 吕丽爽, 汤坚, 何其儗. 何首乌中二苯乙烯苷的制备及抗氧化机理研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2006: 27 - 28, 46 - 47, 61 - 663.

[2] 刘厚淳, 陈万生. 何首乌水溶性成分 2, 3, 5, 4' - 四羟基二苯乙烯 2 - O - β - D 葡萄糖苷体外抗氧化作用研究 [J]. 药学实践杂志, 2000, 18 (4): 232 - 234.

[3] 徐光, 张礼萍, 陈力芳, 等. 二苯乙烯苷类化合物对蛋白激酶 C 的抑制作用 [J]. 药学学报, 1994, 29 (11): 818 - 822.

[4] Kimura Y, Okusa H. Effects of naturally occurring stilbene glucosides from medicinal plants and wine, on tumour

growth and lung metastasis in Lewis lung carcinoma - bearing mice [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2000, 52 (10): 1287 - 1295.

[5] Oh S R, Ryu S Y, Park S H, et al. Anticomplementary activity of stilbenes from medicinal plants [J]. Archives of Pharmacal Research, 1998, 21 (6): 703 - 706.

[6] 刘其礼, 班翊, 张俊红, 等. 二苯乙烯苷对大鼠主动脉舒张作用及其一氧化氮含量的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2004, 18 (4): 289 - 293.

[7] 方微, 张慧信, 王绿娅, 等. 何首乌总甙抑制动脉粥样硬化病变形成 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (2): 175 - 178.

[8] 冯俭, 谢萍. 中药有效成分理化性质分析在新药开发研究中的重要意义与基本方法 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28 (9): 798.

[9] 李菲, 丁忠涛, 曹秋娥. 5 种大黄蒽醌类衍生物解离常数的测定 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32 (2): 166 - 168.

[10] 范晓燕, 于媛, 徐嫔. 酸碱指示剂解离常数的测定 [J]. 实验室科学, 2007, 3 (2): 89 - 90.

[11] 王少兵, 吴祥健, 梅之南. 灯盏花乙素解离常数的测定 [J]. 中南民族大学学报, 2010, 29 (4): 49 - 52.

[12] 张伟, 严娟娟, 杨兆祥. pH 色谱法测定灯盏花乙素解离常数 [J]. 云南大学学报, 2010, 32 (2): 196 - 200.

[13] 晁若冰, 伍朝贯, 贺晓英. 弱酸弱碱性药物 pK_a 值的分光光度测定法 [J]. 华西药学杂志, 1990, 5 (2): 104 - 106.

(编辑: 岳胜难)

Determination of Dissociation Constants of 3, 5, 3', 4' - tetrahydroxy - stilbene - 3' - O - Glu - coside (THSG) by UV Spectrophotometry

XU Ya - zhen¹, YANG Zhao - xiang², ZHANG Wei

(1. Kunming Medical University, Yunnan kunming 650500, China; 2. Institute for Drug Research and Development of Kunming Pharmaceutical Corporation, Yunnan kunming 650100, China)

[ABSTRACT] Objective: To determine dissociation constants of THSG by UV spectrophotometry. Method: THSG was dissolved in Britton - Robinson buffer solutions of different pH values and the absorbance was calculated according to the suitable wavelenth. Results: The pK_{a1} value was found to be 7.90 in Britton - Robinson buffer solutions using wavelengths 319, 325 and 330nm for the determination, and the pK_{a2} value was found to be 10.41 in Britton - Robinson buffer solutions using wavelengths 330, 340 and 350nm for the determination. Conclusion: The present method is convenient and practicable. This study lay the foundation for the investigations of absorption, distribution and metabolism of the durg.

[KEY WORDS] quzhazhigan; UV spectrophome try; dissociation constant