

专论(72~80)

# 水溶液中环糊精包结物的包结常数的测定方法<sup>\*</sup>

续浩,陈亮<sup>\*\*</sup>,马丽花

(山西大学分析测试中心,山西太原 030006)

**摘要:**环糊精(CD)是由6,7,8个葡萄糖基构成的环状化合物,分别叫做 $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD,它们具有“外亲水,内疏水”的独特性质,可以与多种物质形成包结物,而改变物质的特性,因而被广泛应用于各行各业中。在以往研究的基础上,总结了多种测定环糊精包结常数的方法,以便能更好地研究并开发利用具有极大潜力的环糊精。

**关键词:**环糊精;包结物;包结常数

中图分类号:O655.4

文献标识码:A

文章编号:1006-3757(2002)02-0072-09

在 Schardinger 完成了确定环糊精(CD)结构的研究后,对 CD 在化学中的应用研究立即引起了学者们广泛的兴趣。近年来在国内已愈来愈引起应用化学家们的重视,并已在各个应用领域取得了相当显著的成就。CD 包结物的形成常数  $K$  是决定环糊精包结性质的一个重要参数,也是环糊精化学研究过程的一个不可缺少的参数。通过测定  $K$  能对包结平衡作出定量的描述, $K$  值的大小反映了 CD 与客体分子之间结合力的强弱。我们期望本文能提供一个关于环糊精包结物形成常数测定方法的详实背景,在研究工作中根据具体情况选择合适的  $K$  值测定方法。

## 1 基本关系

CD 和客体分子在水溶液中形成包结物是一个动态平衡过程,用式(1)表示:



$$K = [CD \cdot G] / [CD][G] \quad (2)$$

$$[G]_0 = [G] + [CD \cdot G] = [G] + K[CD][G] \quad (3)$$

$$[CD]_0 = [CD] + [CD \cdot G] = [CD] + K[CD][G] \quad (4)$$

CD、G、CD·G 分别代表环糊精,客体分子及它们所形成的包结物, $K$  是包结常数。 $[G]_0$ 、 $[CD]_0$  分别为客体,CD 的总浓度。

目前报道的  $K$  值测定方法有许多种<sup>[1~3]</sup>,它们各有其优缺点和适用范围,现总结如下。

## 2 波谱法测定 $K$

### 2.1 可见-紫外光谱法测定 $K$ <sup>[4]</sup>

当包结物形成时,与原物质相比在可见-紫外光谱图上会有所改变, $K$  值可由 Scott 或 Benesi-Hildebrand 公式计算。

在实验中为了获得可检测到的变化值,客体分子的初始浓度应很低,另一组分的浓度应高些。固定客体分子的浓度,不断改变 CD 浓度,测定客体的摩尔吸光系数,至 达恒定值。假设形成 1:1 的包结物,摩尔吸光系数与 CD 的平衡浓度之间的关系用下面的关系式表示:

$$E = \epsilon \times K \times [CD] \times [G] \quad (5)$$

在实验条件下, $[CD] = [CD]_0$ , $[CD]$  远大于  $[G]_0$ ,所以  $[CD]$  远大于  $[CD][G]/K$ ,

$$E = \epsilon \times K \times [CD]_0 [G]_0 / (1 + K[CD]_0) \quad (6)$$

将(6)式变形,得到 Benesi-Hildebrand 关系式:

$$[G]_0 / E = 1 / (\epsilon \times K \times [CD]_0) + 1 / \epsilon \quad (7)$$

以  $[G]_0 / E$  对  $1 / [CD]_0$  作图,得线性方程,斜率为  $1 / (\epsilon \times K)$ ,截距为  $1 / \epsilon$ , $K = \text{截距} / \text{斜率}$ 。若客体与 CD 形成 1:2 的包结物,则(7)式变为:

$$[G]_0 / E = 1 / (\epsilon K [CD]_0^2) + 1 / \epsilon \quad (8)$$

横坐标为  $[CD]_0^2$ ,仍为良好的线性关系。从图中可求得 1:2 包结物的  $K$  值。用此方法求  $K$  值时需要注意。因为如果形成 1:2 的包结物,本来应该用(8)式

<sup>\*</sup> 山西省出国留学归国人员基金资助课题。

作者简介:续浩,女,1971 年出生,山西大学化学系在读硕士研究生。

<sup>\*\*</sup> 通讯联系人。 收稿日期:2002-03-11; 收到修改稿日期:2002-04-30。

处理,但若用(7)式处理,仍可观察到较好的线性关系,从而导致结论的错误。

## 2.2 诱导的圆二色谱法测定 $K$ <sup>[5]</sup>

当 CD 加入到非手性的客体分子的溶液中时,

$$K = \frac{1 - x}{(x - s) \{ [G]_0 - [CD]_0 (1 - x) / (1 - s) \}} \quad (9)$$

其中,  $x$  代表任意浓度时 CD 与客体的摩尔椭圆率,  $1$  代表只有 CD 存在时 CD 的摩尔椭圆率,  $s$  代表客体完全包结时的摩尔椭圆率。

## 2.3 核磁共振法测定 $K$ <sup>[6,7]</sup>值

已有许多包结物的表观包结常数用核磁共振法求得。此法最常用的根据是<sup>1</sup>H或<sup>13</sup>C的化学位移值。固定客体浓度,改变CD的浓度,观察客体中某些<sup>1</sup>H或<sup>13</sup>C的化学位移值的变化。若自由客体G及包结物CD·G的化学位移分别为 $\delta_G$ 、 $\delta_{CD \cdot G}$ ,实验测定的化学位移 $\delta_{obs}$ 是它们的加权平均值: $\delta_{obs} = f_G \delta_G + f_{CD \cdot G} \delta_{CD \cdot G}$ ,式中 $f_G = [G] / [G]_0$ , $f_{CD \cdot G} = [CD \cdot G] / [G]_0$ , $[G]_0 = [G] + [CD \cdot G]$ ,若令 $\delta_0 = \delta_{CD \cdot G} - \delta_G$ 和 $\delta = \delta_{obs} - \delta_G$ ,可得到: $[CD \cdot G] = [G]_0 \delta / \delta_0$ 。

对于形成 1:1 包结物的平衡,平衡常数表达式:

$$K = \delta / \{ (\delta_0 - \delta) ([CD]_0 - [G]_0 \delta / \delta_0) \} \quad (10)$$

在 $[CD]_0$ 远远大于 $[G]_0$ 的条件下,可以得到线性关系: $\delta / [CD]_0 = K(\delta_0 - \delta)$ ,以 $\delta / [CD]_0$ 对 $\delta$ 作图,直线的斜率等于 $K$ 。同理,若固定 $[CD]_0$ 而变化 $[G]_0$ ,观察CD中H或C的化学位移值的变化,按照上述处理,同样成立。通常,由于CD空腔内壁的H3和H5,分别靠近较大和较小的开口端,因此当CD包结客体时,客体对H3和H5的微扰程度较大,因而在实际应用中,变化客体浓度,观察CD有关质子的化学位移时一般观察H3或H5的改变。

NMR法的优点是准确度高、重现性好、可利用的数据很多,除化学位移外,还可用其它核磁共振数据,如偶合常数、弛豫时间等。更为重要的是,可同时观察主客体的参数的变化。然而,价值昂贵的超导核磁共振仪限制了这一方法的推广和应用。在形成包结物时,时常有空间调节剂或第三组分的存在,或多或少地影响而改变了 $K$ 值,此时用NMR法测定较困难,而荧光法测定 $K$ 有较高的准确度与广泛的实用性。

## 2.4 荧光法测定 $K$

会引起非手性的客体改变其手性。诱导的圆二色谱则是鉴别包结物形成的可靠手段。 $K$ 值可从摩尔椭圆率与CD的浓度关系中求得。公式为:

在荧光体水溶液中加入CD后,其荧光强度增大,这是形成包结物的标志之一,利用荧光强度的变化可测定CD包结物的 $K$ 值。

### 2.4.1 Benesi-Hildebrand法<sup>[8]</sup>

Benesi-Hildebrand法是利用光谱法(包括吸收光谱法和荧光光谱法)测定主客体配合物形成常数的最经典的方法,其表达式见(11)、(12)。

$$[G]_0 [CD] / I = 1 / (K \cdot \epsilon) + [CD] / \epsilon \quad (11)$$

$$1 / I = 1 / (K \cdot \epsilon \cdot [G]_0) + 1 / (\epsilon \cdot [G]_0) \quad (12)$$

其中 $[G]_0$ 是客体的总浓度,对于荧光光谱法, $I$ 为加入CD后荧光强度较无CD时的变化值(实际上是指包结物的荧光强度), $\epsilon$ 为常数。对于吸收光谱法,

$I$ 为吸光度的变化, $\epsilon$ 为摩尔吸光系数差。实验中,以 $1 / I$ 对 $1 / [CD]$ 作图,从所得直线的斜率和截距求得 $K$ ,方法简便。只是用Benesi-Hildebrand法的前提必须是 $[CD]$ 远远大于 $[G]_0$ ,且假设溶液中只有1:1包结物形成。此法已推广应用于三元包结物的研究<sup>[9,10]</sup>。如CD,第一客体G和另一客体(如醇A)组成1:1:1包结体系中,其包结平衡可表达为:



其中的包结常数 $K$ 可由式(14)求出:

$$1 / I = 1 / (\epsilon \cdot K \cdot [A][CD]) + 1 / \epsilon \quad (14)$$

$\epsilon$ 是常数, $[CD]$ 、 $[A]$ 分别是CD及醇的总体浓度。当A过量且浓度已知时,测定客体在有和无CD存在时的荧光强度差 $I$ ,如以 $1 / I$ 对 $1 / [CD]$ 作图得一直线,说明CD·G为1:1<sup>[9]</sup>;若 $1 / I$ 对 $1 / [CD]^2$ 作图得一直线,则表示CD·G为2:1<sup>[10]</sup>,无论哪种摩尔比, $K$ 值均可以方便地从直线的截距除以斜率获得。

关于用Benesi-Hildebrand法求 $K$ 的应用很多。Piroxicam在-CD存在下, $1 / F$ 对 $1 / [CD]^2$ 作图,得到非常好的线性,由此得出平衡常数为 $2.0 \times 10^4$  L/mol,与由吸收光谱得到的平衡常数( $2.2 \times 10^4$  L/mol)相符<sup>[11]</sup>。

### 2.4.2 引入 $I$ 法

对于式(1)所示的 1:1 型包结物,假定 G 与 CD 完全包结时体系的荧光强度为  $I_0$ ,利用物料和荧光强度的加和性可导出式(15)<sup>[12]</sup>:

$$(I - I_0)/(I_0 - I) = K[CD] \quad (15)$$

式中  $I_0$  和  $I$  分别为不存在 CD 和不同 CD 浓度时体系的荧光强度. 实验中测得  $I_0$ 、 $I$  和  $I$  后按式(15)作图所得过零直线的斜率即为  $K$ . 江云宝<sup>[12]</sup>曾用此法测定了对羟基苯甲酸和葱、茈等与  $\beta$ -CD 包结物的形成常数或离解常数. 重排式(15),得:

$$(1 - I_0)/[CD] = KI - KI \quad (16)$$

这时只须测得不同 CD 浓度时的  $I$  值,作  $(I - I_0)/[CD]$  对  $I$  的图,由其斜率可得  $K$ ,从式(16)所表示的直线的斜率与截距可以得到  $I_0$ . 因此在不同的发射波长下实验便可求得一系列  $I$  值,从而计算出环糊精包结物的形成常数. 另外,在式(14)和(15)中,客体浓度并未出现,表明客体的确切浓度并不重要,这对于测定水溶性极小的稠环芳香烃的 CD 包结物的形成常数有很大的优越性. 式(16)实际上也用于吸收光谱法,只是  $I$  这时表示相应的吸光度  $A$ ,显然

$$A/A_0 = \epsilon_{CD-G} G \quad (17)$$

$$I/I_0 = \epsilon_{CD-G} \epsilon_{G-G} G \quad (18)$$

若两式相除则得

$$\epsilon_{CD-G}/G = (I/I_0)(A/A_0) \quad (19)$$

上式所表示的量子产率比是评价 CD 包结物荧光增强效应的一个重要指数,同时对 CD 包结物的理论研究具有重要的意义,可用于阐明第三组分的作用.

### 2.4.3 双倒数法

最近, Bright 等<sup>[13,14]</sup>提出了一种所谓“双倒数法”. 对于式(1)所示的包结过程,包结物的包结常数由(20)式计算:

$$K = \frac{[CD \cdot G]}{\{[G]_0 - [CD \cdot G]\}[CD]} \quad (20)$$

包结物的量子产率由(21)式计算:

$$Q_{CD-G} = I_{CD-G}/K_{CD-G}[CD \cdot G] \quad (21)$$

式中  $Q_{CD-G}$  和  $I_{CD-G}$  分别为包结物的量子产率和荧光强度,  $K_{CD-G}$  是一个与仪器及 CD-G 摩尔吸光系数有关的常数. 联立(19)、(20)两式并整理得

$$[G]_0/I_{CD-G} = (1/Kk_{CD-G}Q_{CD-G}) \cdot (1/[CD]) + (1/K_{CD-G} \cdot Q_{CD-G}) \quad (22)$$

以  $1/I_{CD-G}$  对  $1/[CD]$  作图,可由所得直线的斜率与截距得到  $K$ . 这种曲线图被称为双倒数图,因此把这种方法定义为“双倒数法”.

当包结比为 1:2 (客体:主体) 时,  $1/I_{CD-G}$  对  $1/[CD]$  不再是线性,而是呈现两条交叉的直线. 分别由两条直线,仿照 1:1 的包结物的求法,可以求出  $K_1$ 、 $K_2$ .

Bright 等<sup>[14]</sup>用他们提出的方法测定了苯胺基萘磺酸衍生物与  $\beta$ -CD 包结物的形成常数. 2,6-苯胺基萘磺酸- $\beta$ -CD 在室温下形成 1:1 的包结物,其  $K$  值为 2.080 L/mol; N-甲基-2,6-苯胺基萘磺酸与  $\beta$ -CD 在  $\beta$ -CD 低浓度时形成的是 1:1 的包结物,  $K = 7.360$  L/mol, 继续增加  $\beta$ -CD 浓度时,形成  $K = 300$  L<sup>2</sup>/mol<sup>2</sup> 的 1:2 的包结物.

特别有意义的是“双倒数法”可以提示客体与 CD 之间的多级包结. 这一特点是其它方法所不能及的. 但应指出的是,这里涉及的荧光强度是包结物的荧光强度. 由于 CD 的引入一般对荧光体的荧

光光谱几乎无影响,包结物的荧光强度是通过将总的荧光强度减去自由的荧光体的荧光强度而得到的,后者则用无 CD 时的强度代替,由于 CD 的不断加入,自由的荧光体逐渐减少,因而得到的  $I_{CD-G}$  值有一个负的误差,故当 G 的荧光量子产率相对 CD-G 的不是很小时,结果将有较大的误差. Bright 等研究的苯胺基萘磺酸衍生物在水溶液中荧光很弱,“双倒数法”较为合适. 另外,当  $\beta$ -CD 浓度较高时,荧光强度的倒数随浓度变化极微,布点较密(这使线性关系容易满足). 在测定 CD 包结物时,当 CD 的浓度较高时对客体的包结已近“饱和”,荧光强度随 CD 浓度的变化甚微而几乎达到恒定或在某一数值上下波动(有作者认为 CD 对荧光体可能存在荧光猝灭效应<sup>[15]</sup>,这时或许起较大的作用),实验上的误差也愈来愈显著. 分析 Bright 等的结果,可观察到 1:2 包结物的体系中,  $K$  值很高,这意味着在 CD 浓度较低时,包结过程已接近“饱和”,表现在双倒数图上则在 CD 浓度较低时数据点分布开始变密. 因此在用“双

倒数法确定 CD 浓度较高时多级包结作用存在的结论时应谨慎为之,此时其它方面的证据则是必要的. 江云宝等认为用相分辨或时间分辨可以克服前述  $I_{CD-G}$  数值确定上的误差.

#### 2.4.4 荧光各向异性法

小分子荧光体常温下在水溶液中的荧光偏振(各向异性值)很小;但当结合到大分子上后,分子的有效转动体积增大,转动扩散速率下降,其荧光偏振度显著增大. 这在荧光探针法研究生物大分子体系中已有广泛应用<sup>[16]</sup>. 可以预计,当荧光体被包结进入 CD 空腔后,其荧光偏振(或各向异性值)将增大,据此可以测定包结物的  $K$  值<sup>[17]</sup>. 实验测得自由的和完全被包结的荧光体的各向异性值  $r_f$  和  $r_B$  以及部分被包结时的各向异性值  $r$ ,当荧光体包结前后量子产率不大,则有下式成立:

$$(r - r_f) / (r_B - r) = K[CD] \quad (23)$$

按上式即可得  $K$  值. 江云宝等<sup>[17]</sup>测得苾-CD 的  $K$

值为 610 L/mol,与以前报道的结果 550 L/mol 相近.

荧光各向异性法尤其适于包结前后荧光强度变化不大的情形,恰好这时上述各种稳态方法均不适用. 另外,荧光各向异性法还可用于判断环糊精包结物的形成及存在形式<sup>[17]</sup>.

#### 2.4.5 时间分辨荧光法

荧光体 G 与 CD 形成包结物后,体系中有两种荧光体,即 G 和 CD-G. 对于多环芳烃和 CD 体系,可通过荧光寿命的测量来分辨这两个组份. 体系总的荧光衰减遵循双指数衰减方式,即

$$I(t) = A_{CD-G} \exp(-t/\tau_{CD-G}) + A_G \exp(-t/\tau_G) \quad (24)$$

式中  $\tau$  表示荧光寿命,  $A$  为指前因子(表示  $t=0$  时相应组分对荧光信号的贡献). 利用时间分辨荧光光谱仪获得  $I(t)$  后,按(24)式拟合可得到  $A$  和  $\tau$  值.  $A$  与浓度成正比,即

$$A = C \cdot \epsilon \cdot \phi \quad (25)$$

式中  $C$ ,  $\epsilon$  和  $\phi$  分别表示某组分的浓度,激发波长下的摩尔吸光系数和荧光量子产率,因此有

$$[CD-G]/G = (A_{CD-G} \cdot \tau_G \cdot \phi_G \cdot \epsilon_G) / (A_G \cdot \tau_{CD-G} \cdot \phi_{CD-G} \cdot \epsilon_{CD-G}) \quad (26)$$

代入(1)式,

$$K = (A_{CD-G} \cdot \tau_G \cdot \phi_G \cdot \epsilon_G) / (A_G \cdot \tau_{CD-G} \cdot \phi_{CD-G} \cdot \epsilon_{CD-G}) \cdot 1/[CD] \quad (27)$$

该式在许多实例中难以应用,因它依赖于摩尔吸光系数和荧光量子产率,所以对于具体的体系需作具体的处理. 对于苾-CD 体系,包结的与自由的苾的摩尔吸光系数相同<sup>[18]</sup>. 另外,

$$\tau_{CD-G} \phi_G = \tau_G \phi_{CD-G} \quad (28)$$

将式(28)代入(27)式,则有

$$A_{CD-G} / A_G = K[CD] \quad (29)$$

经拟合得到的  $A_{CD-G}$ 、 $A_G$  值按式(29)处理便可测得  $K$  值. 利用该法 Nelson 等测定了脂肪醇存在下苾-CD 包结物的形成常数<sup>[19]</sup>.

Thomas 等<sup>[20]</sup>则提出了一种荧光猝灭的时间分辨荧光法. 他们认为,对于苾-CD 体系,将其荧光衰减直接按(24)式拟合得到的  $A_{CD-G}$  及  $A_G$  值的准确度较差. 因  $\tau_{CD-G}$  和  $\tau_G$  具有相近的数值. 往体系中引入猝灭剂后,由于苾被包结进入 -CD 空腔而被部分地屏蔽于猝灭剂,包结的苾的猝灭常数显著小于自由的苾,使得  $\tau_{CD-G}$  和  $\tau_G$  值差别增大,从而提高  $A_{CD-G}$  及  $A_G$  拟合值的准确度. Thomas 等<sup>[20]</sup>用 CU 作荧光

猝灭剂,测得苾-CD 包结物的  $K$  为  $44 \pm 6$  L/mol,较文献值小一个数量级. 不难看出,这两种方法较为类似,其数学处理均有一定的近似性,且实验设备昂贵,方法缺乏普遍性. 这些将限制时间分辨荧光法在这一方面的应用.

#### 2.4.6 相分辨荧光法<sup>[13]</sup>

相分辨荧光光谱的基本原理请参阅文献[16]. 此法使用于主客体有不同的荧光寿命的体系. 与稳态荧光法相比,具有准确度高的优点. 因为在稳态荧光法中,由于主客体的荧光谱高度重叠,不可能分辨出各自对总的荧光强度的贡献,计算时采用近似计算,导致负误差. 尤其是当客体的荧光量子产率相对于包结物的荧光量子产率不是很小的时候,这种误差会更大. 相分辨荧光法测定 CD 包结物的  $K$  值是利用自由的与包结的荧光体的荧光寿命的差别(包结物的寿命较长),因此正弦调制的激发光激发荧光体后发射的荧光(也为正弦波)的相移及调制度不同. 对于式(1)所示的包结体系,相分辨荧光强度为  $(p, r, f, i)$ .

$$p. r. f. i(\theta_M) = A_m \cos(\theta_M - \theta_G) + A_{M'} \cos(\theta_M - \theta_{M'}) \quad (30)$$

式中  $\theta_M$  为检测相角,  $\theta_G$ 、 $\theta_{M'}$  分别为 G 和 CD-G 的相角,  $A$ 、 $m$  是常数.

调节检测相角  $\theta_M$  可消除 G 对  $p. r. f. i$  的贡献而得到 CD-G 的  $p. r. f. i$ ; 即选择  $\theta_M = \theta_G + 90^\circ$  时测得的  $p. r. f. i$  则为 CD-G 发射的荧光强度, 即:

$$p. r. f. i = A_{M'} \sin(\theta_{CD-G} - \theta_G) \quad (31)$$

这里  $p. r. f. i$  直接正比于 [CD-G]. 按式(22)作双倒数图可以测定  $K$  值. 该文作者已成功地将此法

用于测定 CD 包结物的  $K$  值以及荧光体与人和牛血清蛋白的结合常数. 这是一种相当新颖简便的方法. 只是设备价格昂贵而使应用受到了限制. 需要指出的是目前国内尚无相分辨荧光光谱仪.

如果可制得 CD-G 的标准溶液, 即客体与 CD 完全包结, 客体总浓度等于包结物的平衡浓度也可用另外一种方法. 通过不断变化检测相角 ( $0^\circ \sim 360^\circ$ ), 记录  $p. r. f. i$ , 再通过下面的方程矩阵, 分别求得 [CD], [G]. 再将 [CD], [G] 代入方程(20)中, 直接求得  $K^{[21 \sim 23]}$ .

$$\begin{pmatrix} I_{G, 1} & I_{CD-G, 1} \\ I_{G, n} & I_{CD-G, n} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} [G] \\ [CD-G] \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} I_1 \\ I_p \end{pmatrix} \quad (32)$$

其中,  $I_{CD-G}$ ,  $I_G$  代表 CD-G, G 的标准溶液中, 每毫摩尔量的 CD-G, G 的  $p. r. f. i$ ,  $I$  代表含中间量的 CD 的样品的  $p. r. f. i$ .

### 3 高效液相色谱法(HPLC)测定 $K$

具体应用时, 任选两个 CD 浓度分别标为  $C_1$  和  $C_2$ , 它们之间的差值以  $C$  ( $C = C_1 - C_2$ ) 来表示, 测得客体分子在不含 CD 流动相中的保留时间为  $T_0$  及被大量 CD 充分包结时的保留时间  $T_c$ , 推得方程式(33)

$$C/T = (K C_1 + 1) \cdot C_2 / (T_0 - T_c) + (K C_1 + 1) \cdot C_2 / (T_0 - T_c) \cdot K \quad (33)$$

式中  $T$  是在 CD 浓度为  $C_1$  和  $C_2$  时客体分子保留时间的差值,  $K$  为客体与 CD 间的表观包结常数. 若维持  $C_1$  为常数而变化  $C_2$ , 则用  $C/T$  对  $C_2$  作图时应得一直线, 用其斜率除以截距便可求得  $K$  值. 这个方法的优点在于灵敏度高, 故需用很少量的客体样品即可完成实验. 测定手续简便、快速, 尤其对于化学性质不够稳定的包结体系以及包结后无光谱性质变化的客体更为适用. 但是 HPLC 法只能用于包结后可引起显著保留时间变化的体系.

### 4 表面张力法测定 $K^{[24, 25]}$

对于具有表面活性的客体, 可方便地用表面张力法估算  $K$  值<sup>[26]</sup>, 被 CD 包结的表面活性剂(SF) 应是其单体分子, 在不同浓度的 CD 存在下, 绘得 SF 的表面张力-浓度曲线, 这曲线中有如下特征:

(1) 在 CMC 后, 表面张力基本保持恒定, 不随 CD 浓度变化而变化;

(2) CMC 随加入的 CD 浓度的增加而增大, 这是由于部分 SF 单体分子被 CD 包结, 使得溶液中 SF 单体分子的浓度降低所致.

设在任一给定的表面张力  $\gamma_1$  时, 所需加入的 SF 浓度为  ${}^0S_1$ , 对于 CD 浓度为  $C$  的体系, 要达到表面张力  $\gamma_1$ , 所需加入的 SF 浓度为  ${}^1S_1$ , 则由于被 CD 包结的 SF 浓度  ${}^bS_1 = {}^1S_1 - {}^0S_1$ . 类似地, 另一表面张力  $\gamma_2$  相应的 SF 的有效浓度为  ${}^0S_2$ , 被包结的 SF 浓度  ${}^bS_2 = {}^1S_2 - {}^0S_2$ , 依此类推, 可得到一组  ${}^0S_i$  和相应  ${}^bS_i$  数据, 根据 Langmuir 等温式, 上述一组数据应有如下关系:

$$1/\bar{n}_i = 1/n + 1/(n \cdot K_A \cdot {}^0S_i) \quad (34)$$

式中,  $\bar{n}_i$  为与每摩尔 CD 结合的 SF 摩尔数 ( ${}^bS_i/C$ ),  $K$  为包结常数,  $n$  为每分子 CD 可包结的 SF 的最大分子数, 在不同的 CD 浓度下, 以  $1/\bar{n}_i$  对  $1/{}^0S_i$  作图, 可得一直线, 由直线的斜率和截距可分别求出  $K_A$  和  $n$ .

### 5 相溶解度法测定 $K$

我们知道 CD 包结物的相溶解等温线有五种类型:  $A_P, A_L, A_N, B_S, B_I$ , 如图 1 所示.  $A_L$  类型随 CD 浓度的增加线性增加, 表明形成 1:1 的包结物.  $A_P$  类型形成的包结物的溶解度更大, 随 CD 浓度的增大 CD 可以和更多的客体分子包结.  $A_N$  类型的包结行为很复杂. 对于  $B_S$  类型, 客体的溶解度先随 CD 浓度的增大而增大, 随后在某一 CD 浓度范围内出现平台, 逐渐沉淀出包结物的结晶. 当所有客体全部转化成包结物时, 包结物的溶解度随 CD 浓度的增加逐级减小, 最后接近包结物的固有溶解度极限  $S_c$ .  $B_I$  类型表明形成的包结物不溶, 客体分子的溶解度不变, 直到全部形成包结物后, 溶解度开始下降. 只有  $A_L$  类型的溶解等温线, 才可从中求  $K$ .

假设包结计量比为 1:1, 则相溶解度方程为:

$$Y = K S_0 / (1 + K S_0) \cdot [CD] + S_0 \quad (35)$$

式中,  $[CD]$  为 CD 的总浓度,  $Y$  为 CD 存在下客体分子的总浓度,  $S_0$  为客体分子的固有溶解度 (曲线的截距),  $K$  为包结物的形成常数.

以客体浓度对 CD 浓度作图, 如图 1, 此图为相溶解度图, 由图中的斜率和截距可获得包结物的形成常数  $K$

$$K = \text{斜率} / \text{截距} (1 - \text{斜率}) \quad (36)$$

Cohen 和 Lach 研究了十九种药物与 CD 形成包结物的情况, 发现这些药物的溶解度与 CD 浓度成正比, 在溶解度图上均呈现出  $A_L$  型直线.

### 6 电化学方法测定 $K$

#### 6.1 电位法<sup>[27]</sup>

对于酸性化合物当它溶解在水中时, 会发生离解反应. 其离解反应用式 (37) 表示



离解的程度用一定温度、一定离子强度下的离解常数来衡量. 离解常数的表示式如下:

$$K = [H][A^-] / [HA] \quad (38)$$

氢离子浓度可用电位测定法测定.

如果体系中加入 CD, 未离解的酸及其离子形式均可与 CD 发生包结反应, 导致形成两个稳定常数不同的包结物. 包结反应及形成常数的表示式为 (39), (40), (41), (42).

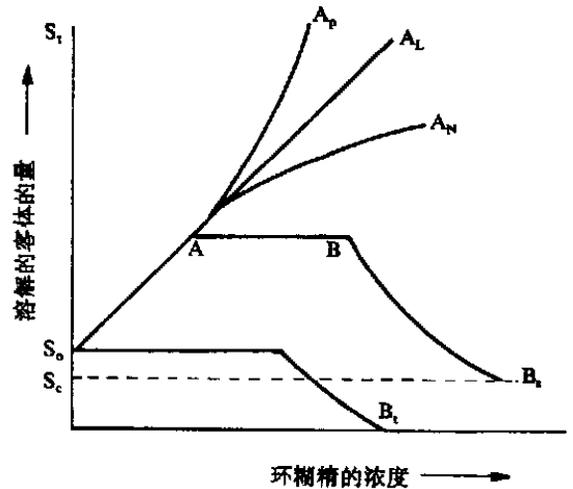


图 1 相溶解度图

$S_0$ : 无 CD 时客体的溶解度  $S_t$ : 溶解客体的浓度  
 $S_c$ : 溶解性差的包结物的溶解极限

相溶解度曲线类型  $A_P, A_L, A_N$ : 包结物易溶解于水  
 $B_S$ : 包结物的溶解度有限  $B_I$ : 包结物难溶解于水

Fig. 1 solubility isotherm types

$S_0$  = solubility of the guest in the absence of CD  
 $S_t$  = concentration of dissolved guest (free + complexed)  
 $S_c$  = solubility limit of the poorly soluble complex  
 Isotherm types  $A_P, A_L, A_N$  = very soluble complexes formed (solubility limit determined by solubility of CD)  
 isotherm  $B_S$  = complex of limited solubility formed  
 isotherm  $B_I$  = insoluble complex is formed

$$K_1 = [CD-HA] / ([HA][CD]) \quad (41)$$

$$K_2 = [CD-A^-] / ([CD][A^-]) \quad (42)$$

同时还存在着两个不同包结物间的酸碱平衡, 即:



离解常数用  $K$  表示如下:

$$K_{CD-HA} = [CD-A^-][H^+] / [CD-HA] \quad (44)$$

整个过程中, CD 和酸 HA 的总浓度用式 (45), (46) 表示.

$$[CD]_0 = [CD] + [CD-HA] + [CD-A^-] \quad (45)$$

$$[HA] = [HA] + [A^-] + [CD-HA] + [CD-A^-] \quad (46)$$

将 (41), (44) 式代入 (45), (46) 后, 得到式 (47), (48).

方程 (47), (48) 说明了用电位法研究包结物形成常数的可能性, 同时也说明了方法的复杂性. 对于这样的体系, 一般采用计算机程序来处理.

#### 6.2 电导率法<sup>[27]</sup>

用电导率法研究包结物的稳定性, 适用于以下



$K_{obs}$ 为 CD 存在时客体物质的表观反应速率常数. 重新排列(58),得:

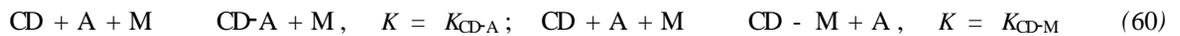
$$K_0 / (K_0 - K_{obs}) = K_0 / \{ K / (K_0 - K_C) [CD] \} + K_0 / (K_0 - K_C) \quad (59)$$

以  $K_0 / (K_0 - K_{obs})$  对  $[CD]^{-1}$  作 Lineweaver-Burk 图,  $K_C$  值由直线的截距算出,  $K$  值由直线的斜率算出. 例如:在水合茛三酮与烟酰胺取代的  $\beta$ -CD 的包结反应中,  $K$  就是由此法求得的. Eadie 的斜率  $K_{obs} = K - K_{obs} K_d / [G]$ , 当测定了不同浓度下的反应速率, 即可求得  $K_d$  值.

## 9 竞争法测定 $K$ <sup>[32]</sup>

对某些客体的包结反应, 包结后并未引起某些易测量参数的改变, 比如说在可见-紫外光谱图上的吸收无明显变化. 在这种情况下, 就可采用竞争包结这样一种快速的方法来求  $K$ .

竞争法的实质就是:在体系中存在两种客体, 它们相互竞争与 CD 反应. 结果形成两个 CD 包结物而同时存在两个  $K$  值. 但是两个客体间并未发生作用, 也没形成三元包结配合物. 形成过程表示如下:



$$K_{CD \cdot A} = ([CD]_T - [CD]) / \{ [CD] ([A]_T - [CD]) + [CD] \} \quad (61)$$

$[CD]_T, [A]_T$  可任意选择, 只有  $[CD]$  值未知.  $[CD]$  值与 M 的吸收有关, 可通过下式求得

$$\frac{E - E_{CD \cdot M}}{E_M - E} = \frac{1}{[CD] K_{CD \cdot M}} \quad (62)$$

其中,  $E_M$  为无 CD 时, M 的吸收,  $E_{CD \cdot M}$  为 M 被全部包结的吸收,  $E$  为包结过程中的吸收. 用此法测定了肾上腺素与 CD 的包结平衡常数.

## 参考文献:

- [1] Bender ML, Koniyama M. Cyclodextrin Chemistry[M]. Springer-Verlag, Berlin, 1978.
- [2] 胡粹青.  $\beta$ -环糊精与茛菪类药物包结反应的热力学研究[J]. 化学学报, 1984, 42(9):856-860.
- [3] 惠永正, 顾建华. 螺旋构象的微环境效应. 1. 羧甲基糖淀粉钠对具有疏水性长链烷基的受物的包结作用[J]. 化学学报, 1981, 39(4):309-317.
- [4] Jozsef Szejtli. Complex dissociation-association equilibria and methods for determination of the stability constants - Spectroscopic methods [M]. Cyclodextrins Technology, Chapter 2, 148, Kluwer Academic Publishers, 1988.
- [5] Jozsef Szejtli. Complex dissociation-association equilibria and methods for determination of the stability constants - Induced circular dichroism [M]. Cyclodextrins Technology, Chapter 2, 150, Kluwer Academic Publishers, 1988.
- [6] Wood DL, et al. <sup>1</sup>H NMR study of the inclusion of aromatic molecules in  $\beta$ -cyclodextrin[J]. J. Am. Chem. Soc., 1977, 99(6):1735-1739.
- [7] Inoue Y, et al. Formation and molecular dynamics of cyclodextrin inclusion complexes with phenylalanine[J]. Bull. Chem. Soc. Jpn., 1981, 54(3):809-816.
- [8] Benesi HA, Hildebrand JH. A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons[J]. J. Am. Chem. Soc., 1949(71):2703.
- [9] Hamai S, et al. Exciplex formation between perylene and N,N-dimethylaniline in a ternary inclusion compound with  $\beta$ -cyclodextrin in H<sub>2</sub>O-ethanol(7:3) mixture[J]. Bull. Chem. Soc. Jpn., 1991, 64(2):431-438.
- [10] Hamai S, et al. Inclusion of azulene and alcohol by  $\beta$ -CD in aqueous solution[J]. J. Am. Chem. Soc., 1992, 114(15):6012-6016.
- [11] Graciela M escandar. Spectrofluorimetric determination of piroxicam in the presence and absence of  $\beta$ -cyclodextrin[J]. The Analyst, 1999, 124:587-591.
- [12] 江云宝, 黄贤智, 陈国珍. [C]. 中国化学会第二届发光分析学术会议论文集, 1988, B72.
- [13] Bright FV, Keimig TL, McGown LB. Thermodynamic binding parameters evaluated by using phase-resolved fluorescence spectrometry[J]. Anal. Chim. Acta., 1985, 175:189-201.
- [14] Ctana GC, Bright FV. Thermodynamic study on the effects of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion with anilino-naphthalenesulfonates[J]. Anal.

- Chem. , 1989 , 61 (8) :905-909.
- [15] Patonay G, et al. A systematic study of pyrene inclusion complexes with  $\alpha$ -,  $\beta$ -cyclodextrins[J]. J. Phys. Chem. , 1986 , 90(9) :1963-1966.
- [16] Lakowicz J R. Principal of fluorescence Spectroscopy[M]. Plenum press , New York and London , 1983.
- [17] 江云宝, 黄贤智, 陈国珍. [C]. 首届长春国际分析化学会议论文集, 吉林大学出版社, 1990 , 12-326.
- [18] Nakajima A. A study of the system of pyrene and  $\beta$ -cyclodextrin in aqueous solution utilizing the intensity enhancement phenomenon[J]. Spectrochimica. Acta. , 1983 , 39A(10) :913-915.
- [19] Nelson G, Patonay G, Warner I M. Effects of selected alcohols on cyclodextrin inclusion complexes of pyrene using fluorescence lifetime measurements[J]. Anal. Chem. , 1988 , 60(3) :274-279.
- [20] Hashimoto S, Thomas J K. Fluorescence study of pyrene and naphthalene in cyclodextrin-amphiphile complex systems [J]. J. Am. Chem. Soc. , 1985 , 107(14) :4655-4662.
- [21] Bright F V, McGown L B. Elimination on bilirubin interference in fluorimetric determination of fluorescein by phase-resolved fluorescence spectrometry[J]. Anal. Chim. Acta , 1984 , 162 :275-283.
- [22] McGown L B, Bright F V. Simultaneous two-component determinations by phase-resolved fluorescence spectrometry[J]. Anal. Chim. Acta. , 1985 , 169 :117-123.
- [23] Bright F V, McGown L B. Four-component determinations using phase resolved fluorescence spectroscopy [J]. Anal. Chem. , 1985 , 57 (1) :55-59.
- [24] Lu R H, Hao J C, Wang H Q, Tong L H. Determination of association constants for CD-SAA inclusion Complexes : A numerical methods based on surface tension measurements [J]. J. Colloid Interface Sci. , 1997 , 192 :37-42.
- [25] Nelson G, Warner I M. The formation of pyrene-Cd complexes in the presence of nonionic surfactants[J]. Carbohydrate Research. , 1989 , 192 :305-312.
- [26] 朱步瑶等. 液体表面张力的测定[J]. 化学通报, 1981 , 6 :21-26.
- [27] Jozsef Szejtli. Complex dissociation-association equilibria and methods for determination of the stability constants - Electro chemical methods [M]. Cyclodextrins Technology , Chapter 2 , 150-152 , Kluwer Academic Publishers , 1988.
- [28] Eftink M R, Harrison J C. Calorimetric studies of *p*-nitrophenol binding to CD[J]. Biochemistry , 1981 , 10 :388-398.
- [29] Biltonn R L, Langerman N. Methods in enzymology (C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff, Eds.) [M]. Academic Press , New York , 1979 , 61 :287-388.
- [30] Michael B Clark, Jr Joseph A, Gardella Jr, Thomas M. Schultz Dilip G. Patil and Lawrence Salvati Jr. Solid-state analysis of eumelamin biopolymers by electron spectroscopy for chemical analysis[J]. Anal. Chem. , 1990 , 62(9) :949-956.
- [31] 吾满江·艾力, 陈文海, 陈 炜. 非离子表面活性剂和 CD 包结作用的微量热法研究[J]. 化学学报, 2000 , 58 (1) :127-130.
- [32] Jozsef Szejtli. Complex dissociation-association equilibria and methods for determination of the stability constants - Competition methods [M]. Cyclodextrins Technology , Chapter 2 , 153 , Kluwer Academic Publishers , 1988.

## Determination of Formation Constant on Cyclodextrins Inclusion Complexes

XU Hao , CHEN Liang , MA Li-hua

(The test and analysis center of shanxi University , Yaiyuan Shanxi 030006 ; China)

**Abstract :** Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides , mostly consisting of six , seven and eight glucoses units for  $\alpha$  ,  $\beta$  ,  $\gamma$ -CD respectively. They have the unique character , so they can form inclusion complexes with various guests with suitable characteristics of polarity and dimension. Formation constant is an important factor to determine the inclusion behavior. Lots of concerned methods based on references were reviewed.

**Key words :** cyclodextrins ; inclusion complexes ; formation constant

**Classifying number :** O655. 4