

大型仪器在食、药品安全中的应用成果(009~014)

毛细管区带电泳法测定 3 种香豆素的离解常数

黄端华^{1,2}, 张 兰²

(1. 福建船政交通职业学院, 安全技术与环境工程系, 福建 福州 350007;
2. 食品安全分析与检测技术教育部重点实验室, 福州大学化学学院, 福建 福州 350108)

摘要: 采用毛细管区带电泳法(CZE)测定瑞香苷(DN)、瑞香素(DP)和 7-羟基香豆素(7-HC)的离解常数(pKa)。通过测试不同酸度条件下各香豆素的迁移时间,以香豆素在电泳中有效淌度和运行液中 OH⁻浓度的关系,推导了毛细管区带电泳-紫外分光光度(CZE-UV)法测定 3 种香豆素离解常数(pKa)的线性模型,并建立了这 3 种香豆素的 pKa 测定方法。测得 3 种香豆素的 pKa 值分别是 7.43(7-HC)、6.91(DN)和 6.86(DP)。同时也采用传统方法-紫外分光光度法对这些物质的 pKa 进行测定以验证 CZE 的可靠性,两种测定结果相一致,说明 CZE-UV 法用于 3 种香豆素的离解常数的测定,快速、简便、结果可靠。

关键词: 毛细管区带电泳; 离解常数; 7-羟基香豆素; 瑞香苷; 瑞香素

中图分类号: O657.33

文献标志码: B

文章编号: 1006-3757(2016)01-0009-06

DOI: 10.16495/j.1006-3757.2016.01.002

Determination of Dissociation Constants of Coumarins by Capillary Zone Electrophoresis

HUANG Duan-hua^{1,2}, ZHANG Lan²

(1. *Fujian Chuan Zheng Communication College, Safety and Environmental Engineering Department, Fuzhou 350007, China;*

2. *Ministry of Education Key Laboratory of Analysis and Detection for Food Safety, College of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China)*

Abstract: Capillary zone electrophoresis (CZE) is applied to the determination of dissociation constants of coumarin derivatives (daphnin, daphnetin and umbelliferone). Capillary electrophoresis is an attractive method for pKa measurements, which is based on the migration time or mobilities of ionic species over a range of pH values. The pKa values of three coumarins is 7.43(7-HC), 6.91(DN) and 6.86(DP). The method was validated by the comparison of results obtained by a traditional method, UV spectroscopy. No distinct difference was observed between the two methods. The CZE-UV method for pKa measurement shows good repeatability and reliability.

Key words: CZE; dissociation constants; daphnin; daphnetin; umbelliferone

离解常数(pKa)作为物理常数,在药物化学研究中有着重要的作用。药物的 pKa 将决定弱酸性或弱碱性药物的离子化程度,影响血药浓度和反应速

率,影响药物的跨膜被动转运,进而影响药物的吸收分布排泄。因此,药物的解离常数对于生命体中的一些化学现象包括生物吸收和药物代谢过程的解析

收稿日期: 2016-01-13; 修订日期: 2016-02-29.

基金项目: 福建省教育厅资助项目(JA11303)

作者简介: 黄端华(1981-),女,讲师,硕士,研究方向为色谱分析

通信作者: 张兰(1963-),教授,博士生导师,主要从事色谱、质谱联用技术和复杂体系分离分析及生物电化学领域的研究,

E-mail: zlan@fzu.edu.cn.

有着极为重要的作用^[1]。

测定 pKa 的传统方法一般采用紫外分光光度法及电位滴定法。这些方法不具备同时分析多个组分的特性,比较费时,所需样品量也较多。毛细管区带电泳(CZE)由于其分离模式本身的特性,已经被用于离解常数的测定^[2-5]。该方法在测定 pKa 时有着明显的优势:(1) 样品用量少;(2) 不需准确定量样品,只需记录迁移时间;(3) 可同时测定多个组分的 pKa。

已有文献报道测定瑞香苷(DN)的水解常数及同时测定祖师麻中紫丁香苷、7-甲氧基香豆素、瑞香苷(DN)、瑞香素(DP)和7-羟基香豆素(7-HC)等5种组分的含量^[6-7]。瑞香苷(DN)、瑞香素(DP)和7-羟基香豆素(7-HC)是祖师麻中含量较多且比较稳定的3种物质,其结构式如图1所示。本文尝试采用毛细管电泳(CE)进行其离解常数的测定。这3种香豆素在药理上被广泛研究,但是其离解常数 pKa 的同时测定至今尚未有文献报道。

本文利用电泳的基本理论和一元有机酸的电离平衡理论,推导出了 $1/\mu_{ef}$ 对 $[\text{OH}^-]$ 的线性关系。以这种关系为基础,首次同时测定了祖师麻药物中3种香豆素的 pKa 值。

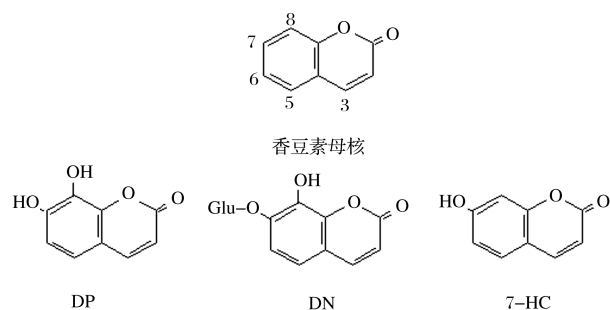


图1 DP、DN 和 7-HC 3 种香豆素的结构式

Fig.1 Structures of DP、DN and 7-HC

1 理论基础

1.1 毛细管电泳-紫外分光光度(CE-UV)测定 pKa 的线性模型

从结构式可以看出,由于这3种香豆素主要是在香豆素环上进行解离,因此呈弱酸性。根据弱酸(HA)的电离平衡: $\text{HA} = \text{H}^+ + \text{A}^-$, 电离常数(K_a)为:

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (1)$$

式中 $[\text{H}^+]$ 、 $[\text{A}^-]$ 及 $[\text{HA}]$ 分别表示平衡时3种形态

的浓度。离子 A^- 的分布系数 α 可表示为:

$$\alpha = \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}] + [\text{A}^-]} = \frac{[K_a]}{[K_a] + [\text{H}^+]} \quad (2)$$

A^- 在一定酸度的缓冲溶液中,其有效淌度(μ_e)可表示为绝对淌度(μ_A)与分布系数 α 的乘积,见公式(3)^[8]:

$$\mu_e = \alpha \mu_A \text{ 即 } \mu_e = \frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]} \cdot \mu_A \quad (3)$$

μ_e 值还可通过公式(4)^[8]表示:

$$\mu_e = \mu_{app} - \mu_{eof} = \frac{L_d L t}{V} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_0} \right) \quad (4)$$

式中, L_d 为毛细管的有效长度, L 代表毛细管的总长, μ_{eof} 为中性标记物的电渗迁移率, μ_{app} 为表观淌度, V 是电泳系统的分离电压(V), t_m 和 t_0 分别是样品的迁移时间和中性标记物的迁移时间(s)。

从式(2)、(3)可整理得:

$$\frac{1}{\mu_e} = \frac{[\text{H}^+]}{K_a \cdot \mu_A} + \frac{1}{\mu_A} \quad (5)$$

水的离解常数为:

$$K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-] \quad (6)$$

将(6)式代入(5)式得:

$$\frac{1}{\mu_e} = \frac{K_w}{K_a \cdot \mu_A} \cdot \frac{1}{[\text{OH}^-]} + \frac{1}{\mu_A} \quad (7)$$

从式(7)可知: μ_e^{-1} 与 $[\text{OH}^-]^{-1}$ 成线性关系,通过 μ_e^{-1} 与 $[\text{OH}^-]^{-1}$ 线性拟合,可通过该曲线的斜率得到 K_a 值。

1.2 紫外分光光度(UV)法测定 pKa

测定 pKa 的传统方法之一为分光光度法。其 pKa 的测定可通过式(8)^[9]计算:

$$\text{pKa} = \lg \left(\frac{A - A_A}{A_{HA} - A} \right) + \text{pH} \quad (8)$$

式中, A 为不同 pH 溶液中的吸收度; A_{HA} 为强酸溶液的吸光度,即样品完全为分子状态的情况下; A_A 是样品处于完全解离形态测得的吸光度。不同 pH 下, pKa 是一个恒定的值,计算不同 pH 下所求得的 pKa 的平均值,即得出所求的 pKa。

2 试验部分

2.1 仪器与试剂

2.1.1 仪器

毛细管电泳仪(LUMEX CAPEL105 型,俄罗斯 LUMEX 公司),紫外检测器(190 ~ 400 nm),

M1cw15 数据处理工作站;石英毛细管柱(未涂层, $\Phi 75\text{ }\mu\text{m}$):有效长度为 54 cm,总长度为 62 cm(河北永年光纤厂);pHS-3C 型精密酸度计(上海大中仪器有限公司);分光光度计:Lambda 800 UV/vis spectrometer (Perkin Elmer instruments).

2.1.2 试剂

试验用标准品为瑞香素(北京药品生物制品检定所提供)、7-羟基香豆素(购自百灵威公司)、瑞香苷(中国药科大学植物化学教研室提供); KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 、 NaOH 、 HCl 、乙醇和标记物苯酚均为 AR 级,购自上海试剂总公司;水为去离子水.

2.2 试验方法

2.2.1 缓冲溶液的配制

分离缓冲液(pH 5.80 ~ 9.30)的配制:由 0.1 mol/L KH_2PO_4 和 0.05 mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (KDP-B)溶液,根据化学手册表格配成 pH 范围为 6.12 ~ 9.28 的系列缓冲溶液,稀释 10 倍,在室温(20 $^{\circ}\text{C}$)下,通过酸度计准确测定其 pH 值分别为:6.12、6.36、6.58、6.76、6.94、7.18、7.51、7.75、8.03、8.12、8.35、8.50、8.68、8.84、8.95、9.13、9.28.

NaOH :0.01 mol/L; HCl :0.01 mol/L.

由于 pH 9.30 以下苯酚基本无解离,可作为中性物,因而选择苯酚作为电渗流标记物. 配制质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的苯酚添加到样品中作为标记物.

2.2.2 标准溶液的配制

准确称量一定量的 DN、DP 和 7-HC 等 3 种样品,采用质量分数为 20% 的乙醇进行溶解、定容,制备 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准样品储备液. 用时只需用特定 pH 值的缓冲溶液将其稀释到所需的质量浓度即可.

在 CZE 试验中,所采用的溶液均使用去离子水配制,并用 0.22 μm 滤膜过滤,过滤后经超声震荡 1 min 去除溶液内的气泡. 分析时选择压力进样方式,时间持续 10 s. 紫外检测波长为 224 nm. 测定电压 20 kV,混合标准样在各个 pH 处平行分析 3 次. 试验在(20 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 的室温下完成.

2.2.3 试验过程

CE-UV 法:取一定体积的 DN、DP 和 7-HC 混合样品于电泳用小号塑料离心管中,分别加入一定体积苯酚溶液,使用作为运行液的 KDP-B 缓冲液定容,使样品质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 选择与预测 pKa 值较接近的 pH 缓冲液进行电泳分析,并使温

度恒定为 20 $^{\circ}\text{C}$,同时测定并记录样品及标记物的迁移时间.

分光光度法:分别取一定体积的 DN、DP 和 7-HC 母液,用 0.01 mol/L NaOH 和 0.01 mol/L HCl 及 pH 分别为 6.12、6.39、6.71、6.94、7.34、7.72、8.02、8.27 的 10 mmol/L KDP-B 缓冲溶液,将样品稀释为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$,室温 20 $^{\circ}\text{C}$,在分光光度计上,用相应酸度的缓冲液为参比,选择使用厚度 2 mm 的石英比色皿,在 200 ~ 400 nm 处进行扫描. 选择曲线平滑并随 pH 连续变化处的波长,获得其吸光度以及样品在 HA 与 A^- 状态时的吸光度 A_{HA} 和 A_{A^-} .

3 结果与讨论

3.1 电泳条件的选择

对于离解常数的测定,首先是 pH 范围的确定. 选择的 pH 范围必须保证 pKa 值落在其中且各组分在该范围内能实现分离. 由于与这 3 种香豆素结构相近的物质,其 pKa 值^[10]在 5.80 ~ 9.20 范围内,因此选择 pH 的合适范围为 5.80 ~ 9.20. 满足 pH 在该范围的缓冲溶液主要有磷酸缓冲溶液、硼酸缓冲溶液等. 当硼砂-硼酸缓冲液的 pH 值低于 9.0 时,3 种组分无法实现基线分离;而 KDP-B 缓冲液对这 3 种组分具有较高的分离选择性,且在 pH 5.80 ~ 9.20 之间不需要使用酸碱调节其值,容易获得准确的浓度和离子强度,因此选择了 KDP-B 缓冲液作为 DN、DP 和 7-HC 进行常数测定的最佳电泳介质.

缓冲液的浓度较大影响电离常数的测定. 较大的缓冲液浓度使样品的酸度更加稳定,离子强度保持为常数,但缓冲液的浓度也不宜过高,否则在电泳分析中会产生焦耳热. 通过试验优化选择了 10 mmol/L 的 KDP-B 运行液,从表 1 中可以看出电流值保持在 23.0 ~ 36.0 nA 之间,具有较稳定的 pH 和离子强度,测得的电离常数误差较小. 在最佳的电泳条件下,得到 DN、DP 和 7-HC 3 种组分的标准电泳谱图如图 2 所示.

3.2 pKa 常数的测定

3.2.1 毛细管电泳法

根据试验方法中的操作条件,不同 pH 值的标准混合样品各自运行 3 次,得到样品及标记物的迁移时间,根据公式(4)计算出有效淌度值,取平均值. 画出有效淌度和酸度 pH 的关系图,如图 3 所示. 进行非线性回归, pKa 值将落在每一段回归曲线的拐点上,从图中可以直观的看出 DN 的 pKa 最

表 1 测定不同 pH 下的电流强度

Table 1 Current intensity for coumarins in used electrolyte solutions at different pHs

pH	电流强度/ μA	pH	电流强度/ μA	pH	电流强度/ μA
6.36	27.6	7.51	35.0	8.81	27.6
6.58	30.4	7.75	25.6	8.95	29.0
6.76	29.2	8.12	36.0	9.13	23.0
6.94	29.4	8.35	30.2	9.28	23.2
7.18	22.6	8.50	29.8		
7.34	26.6	8.68	28.2		

分析条件: 10 mmol/L KDP-B 缓冲溶液, 分离电压 20 kV, 紫外检测波长 224 nm.

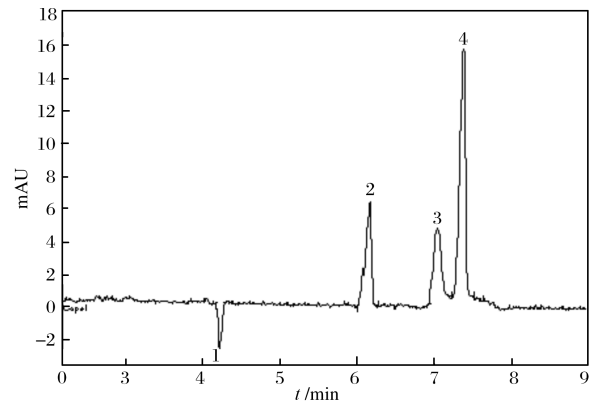


图 2 DN、DP 和 7-HC 的电泳谱图

Fig. 2 Electrophorograms of DN, DP and 7-HC

分析条件: KDP-B (10 mmol/L), pH 9.10;
分离电压 20 kV; 紫外检测波长 224 nm;
进样条件: 30 mbar, 10 s
(2) DN (50 $\mu\text{g/mL}$); (3) DP (50 $\mu\text{g/mL}$);
(4) 7-HC (50 $\mu\text{g/mL}$)

小, 其次是 DP, 7-HC 的 pKa 值最大. 为了获得精确 pKa 测定结果, 根据公式 (7), 使用 Excel 软件对数据进行线性拟合, 得到如图 4 所示的曲线.

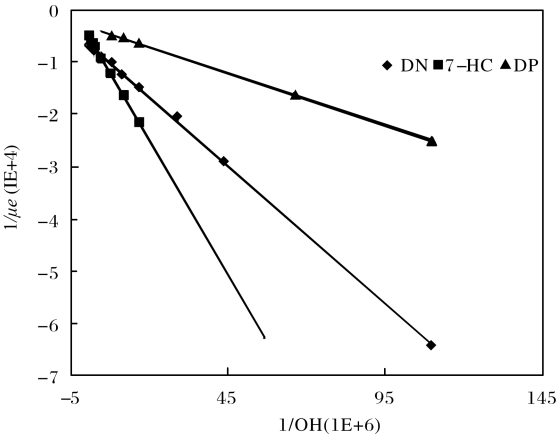


图 4 有效淌度倒数和 1/[OH⁻] 的线性回归

Fig. 4 Reciprocal electrophoretic mobility vs function of 1/[OH⁻]

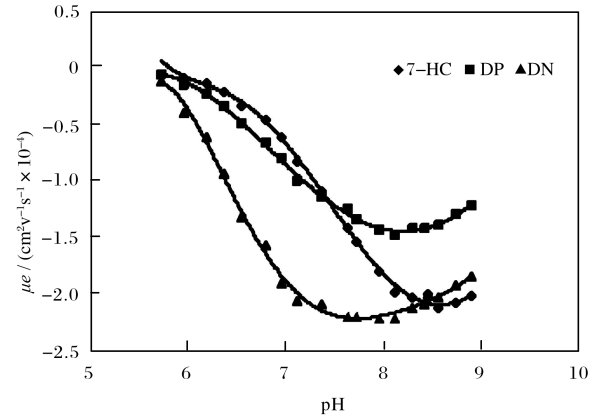


图 3 有效淌度与酸度之间的关系

Fig. 3 Relationship between buffer pH and effective mobility

根据所拟合的线性回归方程, 其相关系数大于 0.999 0, 由斜率可计算各组分的 pKa 值. 其计算结果如表 2 所列.

3.2.2 紫外分光光度法

在 20 $^{\circ}\text{C}$ 下, 按照试验方法, 在强酸、强碱条件及 pH 分别为 6.12、6.39、6.71、6.94、7.34、7.72、8.02、8.27 时, 对波长在 200 ~ 400 nm 处进行全程扫描. 按波长选择原则, 选择各 pH 下摩尔吸光系数 ϵ 较大的波长. 根据扫描的谱图, 选定了 351.22 nm (7-HC)、360.11 nm (DP) 和 355.81 nm (DN) 处的波长. 记录各 pH 点及强酸、强碱情况下, 样品各种形态吸光度的平均结果. 将所获得的结果代入公式 (9),

计算各个样品的 pKa. 所获得的结果如表 2 所列.

表 2 7-HC、DN 和 DP 的 pKa 测定值
Table 2 Determination of pKa values

化合物	毛细管电泳法	紫外分光光度法
7-HC	7.36	7.43
DN	6.92	6.91
DP	6.81	6.86

other conditions as table 1

从表 2 可以看出,通过毛细管电泳法测得的 3 种香豆素的 pKa 与紫外分光光度法所测得的结果相近,可见 CE 法用于 pKa 的测定是准确可靠的. 从 3 种香豆素 pKa 值的比较可以看出,虽然三者结构相似,离解常数却各异,7-HC 的 pKa 值最大,解离程度最小,DN 与 DP 的解离常数比较接近,但 DP 小于 DN.

3.3 pKa 值与分子结构的关系

由于物质 pKa 的大小主要受分子结构的影响. 质子在香豆素母核(如图 1 所示)上,由于共轭效应的影响,核磁共振谱中 C₄、C₅ 和 C₇ 的质子信号处在较低场,而 C₃、C₆ 和 C₈ 的质子信号在较高场^[11],如图 5 所示. 处于高场的碳原子上质子所经受的屏蔽效应大,即该碳原子的电子云密度大,电负性大. 所以电负性所产生的诱导效应将使该位置上羟基的酸性较强. 从这一点出发,可以预见,C₃、C₆ 和 C₈ 上的取代羟基的酸性将比 C₄、C₅ 和 C₇ 强,即 pKa 会更小. 另外,从化学位移值的比较,可以预见每一个位置上的取代羟基酸性的大小为 C₈>C₆>C₅>C₇>C₄,pKa 大小为 C₄>C₇>C₅>C₆>C₈. 而本试验的结果为 7-HC 的 pKa 大于羟基取代位置在 8 号的 DN,与该理论完全符合.

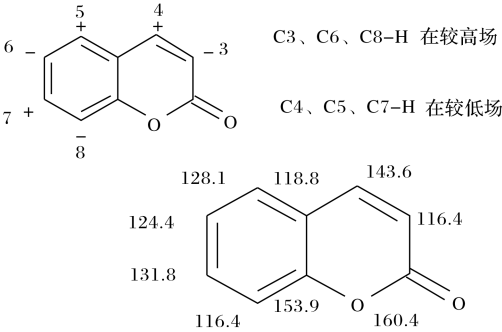


图 5 碳原子在香豆素母核上的化学位移值

Fig.5 Chemical shift values of carbon atom on coumarin

当出现香豆素的母核上有相邻的两个羟基的情形,在溶液中这两个羟基便会形成氢键. 由于 DP 分子结构中有两个相邻 OH⁻分布在 C₈和 C₇位置,且 C₈位置的电负性要大于 C₇,因此 C₈上的 O 原子将会和 C₇位置的 H 形成氢键. 氢键的形成使得图 6 的结构式更加稳定,那么 8 号位上氢离子的电离就更加容易,酸度也增加,pKa 值将更小. 试验结果表明,尽管 DN 与 DP 一样,在 8 号位上均有取代羟基,但是含有两个羟基的 DP,其 pKa 值小于 DN.

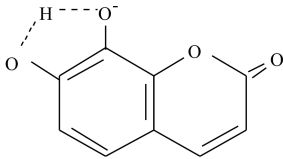


图 6 形成氢键的结构图

Fig.6 Formation of hydrogen bond on coumarin

4 结论

本文采用 CZE-UV 建立了在较宽的 pH 范围内分离 3 种香豆素快速而简便的方法,并成功地应用于 3 种香豆素 DN、DP 和 7-HC 的 pKa 测定. 通过 CZE-UV 所测的 pKa 值符合理论上的解释,并和分光光度法进行比较,结果较为接近,从而证明了毛细管电泳对样品离解常数的测定是比较可靠的,有望进一步推广.

参考文献:

[1] Gluck S J, Cleveland Jr J A. Capillary zone electrophoresis for the determination. of dissociation constants [J]. J Chromatogr A, 1994, 680:43-8.

[2] Haixia Ren, Licheng Wang, Xusheng Wang, et al. Measurement of acid dissociation constants and ionic mobilities of3-nitro-tyrosine and 3-chloro-tyrosine by capillary zone electrophoresis [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013, 77: 83-87.

[3] Paweł Nowak, Michał Wo'zniakiewicz, Paweł Ko'scielniak. Application of capillary electrophoresis in determination of aciddissociation constant values [J]. Journal of Chromatography A, 2015, 1377:1-12.

[4] 朱金花,吴立业,刘绣华. 乙酸和一氯乙酸电离常数的高效毛细管区带电泳法测定[J]. 化学研究,2012, 23(3):7-10.

[5] 李玉琴,张传港,宗素艳,等. 高效毛细管电泳法测

定磺胺类药物的离解常数及其制剂的含量[J]. 药物分析杂质,2008,28(2): 243-246.

[6] 黄端华,何聿,童萍,等. 毛细管电泳用于瑞香苷水解常数的研究[J]. 分析测试技术与仪器,2007,13(4):253-258.

[7] 黄端华,卢明华,张兰. 胶束毛细管电动色谱法用于祖师麻中 5 种主要成分的测定[J]. 分析测试技术与仪器,2014(3):168-174.

[8] 陈晓峰,翟红林. 毛细管电泳同时测定酚类系列化合物的表观离解常数[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2005,41(1):52-56

[9] 张兰,陈国南,方禹之. 毛细管电泳- 电化学检测法用于生物碱电离常数线性模型的研究[J]. 化学学报,2004, 62(10):975-978

[10] Hongyi Zhang QL, Zhihong Shi, Zhide Hu, et al. Analysis of aesculin and aesculotin in Cortex fraxini by capillary zone electrophoresis[J]. Talanta, 2000, 52: 607-21.

[11] 蔡玉鑫. 罗布麻花化学成分的研究[D]. 新疆:新疆大学,2007;21-22.

声明

本刊许可中国学术期刊(光盘版) 电子杂志社数字化传播的声明

本刊已许可中国学术期刊(光盘版) 电子杂志社在中国知网及其系列数据库产品中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。该社著作权使用费与本刊稿酬一并支付。作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意我社上述声明。

《分析测试技术与仪器》编辑部