

# 区段-区段动力学毛细管电泳测定动力学参数的新方法及其应用

熊彩侨<sup>①</sup>, 夏之宁<sup>①②\*</sup>, 黄锐<sup>②</sup>, 陈华<sup>①</sup>, 徐盼<sup>①</sup>

① 重庆大学化学化工学院药理学系, 重庆 400044;

② 重庆大学生物工程学院, 重庆 400044

\* 联系人, E-mail: [chem\\_lab\\_cqu@yahoo.com.cn](mailto:chem_lab_cqu@yahoo.com.cn)

收稿日期: 2008-01-31; 接受日期: 2008-02-25

国家自然科学基金项目(批准号: 20775096)资助

**摘要** 建立了一种可同时测定  $k_{\text{on}}$  和  $k_{\text{off}}$  这两个动力学参数的区段-区段动力学毛细管电泳(ppKCE)新方法, 以测定西酞普兰与 BSA 的亲 and 相互作用体系的动力学参数  $k_{\text{on}}$ ,  $k_{\text{off}}$  及结合常数  $K_b$  值进行了方法的具体应用, 采用时间比的方法对所测得的结果进行了验证. 该方法操作更为简便, 可有效避免常规 ppKCE 存在的限制, 并降低了对毛细管电泳分离度及检测灵敏度的要求, 拓展了动力学毛细管电泳的应用领域.

**关键词**

相互作用  
毛细管电泳  
动力学参数  
ppKCE

## 1 引言

药物与蛋白的非共价相互作用包括药物与蛋白的结合及离解两个可逆的动力学过程. 在血浆中, 由于与蛋白结合的药物难于通过毛细血管壁, 只有游离的药物才可到达靶器官, 发挥药效及药理活性, 因此药物与血浆蛋白相互作用的动力学过程在药代动力学、药效学中都起着重要的作用, 结合程度的定量研究对于药代动力学研究更是必需的<sup>[1~3]</sup>.

药物与蛋白的定量结合参数  $K_b$  由结合速率常数  $k_{\text{on}}$  和离解速率常数  $k_{\text{off}}$  的比值决定. 单独的  $K_b$  值仅能描述药物与蛋白结合的状态, 而动力学参数  $k_{\text{on}}$  和  $k_{\text{off}}$  对于生物过程的动力学描述、靶向药物药代动力学的测定以及定量亲和分析的设计都是必要的<sup>[4]</sup>, 是影响药效发挥和药理活性的重要参数. 直接测定单独的  $k_{\text{on}}$  和  $k_{\text{off}}$  的传统方法分别为停止-流动光谱和表面等离子体共振法<sup>[4]</sup>. 而在停止-流动光谱中, 测定  $k_{\text{on}}$  值所需的光谱变化通常不明显, 限制了该方法在非共价相互作用研究中的应用. 表面等离子体共振为非均相反应, 存在非特异性结合以及吸附现象, 因此很难

准确的测定结合参数, 另外, 固定受体或配体的程序费时且昂贵, 这些也都限制了这种方法的发展和应用. 动力学毛细管电泳是一个测定动力学参数的强大工具, 可同时测定  $k_{\text{on}}$  和  $k_{\text{off}}$ , 其中两种物质的相互作用发生在均相溶液并且这种相互作用是动态的.

ppKCE<sup>[4,5]</sup> 是动力学毛细管电泳中一种能直接测定  $k_{\text{on}}$  和  $k_{\text{off}}$  的模式. 在这种方法中, 假设 A 物质的迁移速度比 B 快, 则一小区段 B 物质首先被注入毛细管中, 然后注入一小区段 A 物质; 当施加电压时, A 物质穿过 B 物质, 二者结合产生复合物 C; 当 A 物质穿过 B 物质后, C 物质则开始离解, 再生成 A 和 B; 进而可根据电泳谱图对动力学过程的记忆功能对动力学参数进行求解. ppKCE 中存在以下两个假设: (1) A、B 两种物质相互作用的结合比为 1:1; (2) 当区带 A 穿过区带 B 时, 只发生 A、B 两种物质的相互结合; 当区带 A 和 B 被分开后, 只发生 C 物质的离解反应. 但传统的 ppKCE 方法主要用于 DNA 与蛋白的大分子间相互作用研究, 在动力学参数的计算中利用峰 A 和 B 的面积参数并基于传质微分方程进行数学建模, 其推导过程复杂并

在实验中要求确保荧光标记DNA的量子产率在与蛋白结合后不发生变化。

本文在保持ppKCE的进样方式及假设条件不变的前提下,从动力学参数 $k_{\text{on}}$ 和 $k_{\text{off}}$ 的原理出发,基于毛细管电泳中物质的峰高和浓度间的关系建立了更简单的ppKCE新方法,并将ppKCE的应用领域拓展到了小分子与蛋白之间的快速相互作用体系的研究。另外,对单一物质峰高的测定使得对C物质的测得不再成为必要条件,降低了对于检测灵敏度及电泳分离度的要求。在建立ppKCE新方法的基础上,我们对长期治疗抑郁药西酞普兰与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用进行了研究,测定了动力学参数 $k_{\text{on}}$ ,  $k_{\text{off}}$ 以及结合常数 $K_b$ ,并采用时间比的方法<sup>[6]</sup>对测定的结果进行了验证。

## 2 动力学参数计算的理论基础

根据 ppKCE 中的假设条件,电泳过程中的相互作用过程可如图 1 所示:

其中 A 组分的迁移速度比 B 组分快,在电泳的过程中,存在着结合和解离两个过程。

设进样时 A 和 B 的浓度分别为  $a$  和  $b$ ,二者混合后发生相互作用时体系中 A 和 B 的浓度分别变为  $a_0$  和  $b_0$ ,其计算公式分别为:

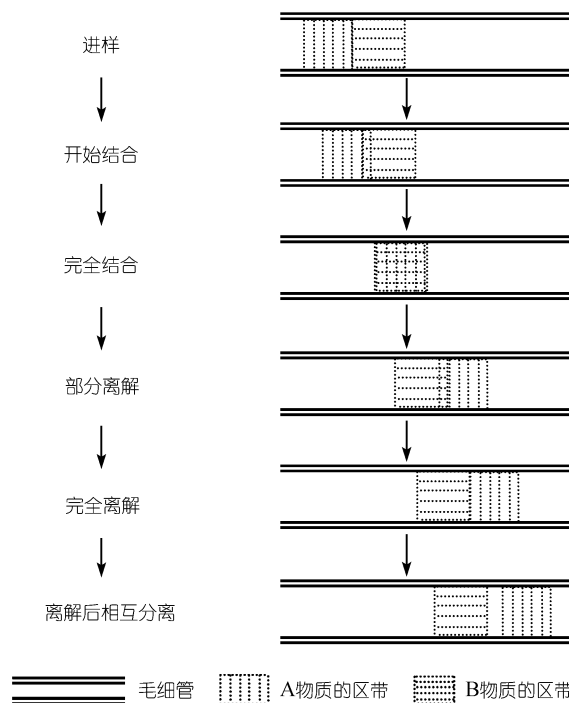


图 1 ppKCE 相互作用过程的示意图

$$a_0 = \frac{l_A}{l_A + l_B} a, \quad (1)$$

$$b_0 = \frac{l_B}{l_A + l_B} b. \quad (2)$$

$l_A$ 、 $l_B$  分别为 A、B 两种物质进样区带的长度,可通过式(3)获得。

$$l_{\text{in}} = \frac{gr^2\rho}{8\eta l_{\text{total}}} ht_{\text{in}}. \quad (3)$$

其中,  $g$  为重力加速度,  $r$  为毛细管的半径,  $\rho$  为溶液的密度,  $\eta$  为流体黏度,  $l_{\text{total}}$  为毛细管的总长,  $h$  为进样时的高度差,  $t_{\text{in}}$  为进样时间。

结合过程: 当 A 穿过 B 时, A 和 B 结合生成 C, 如下式:

$$\begin{array}{lcl} & \xleftarrow{k_{\text{on}}} & \text{A} + \text{B} \\ t = 0 & 0 & a_0 \quad b_0 \\ t = t_1 & c_1 & a_1 \quad b_1 \end{array} \quad \left( t_1 = t_{\text{pass}} = \frac{l_A + l_B}{v_B - v_A} \right). \quad (4)$$

根据 $k_{\text{on}}$ 的定义<sup>[7]</sup>,其值可由下式获得:

$$k_{\text{on}} = \frac{1}{t_1(a_0 - b_0)} \ln \frac{b_0 a_1}{a_0 b_1} = \frac{1}{t_1(a_0 - b_0)} \ln \frac{b_0(a_0 - c_1)}{a_0(b_0 - c_1)}, \quad (5)$$

其中  $a$ 、 $b$ 、 $c$  分别为 A、B、C 3 种物质的浓度,  $v_A$ 、 $v_B$  分别为 A、B 两种物质在电泳中的迁移速度,其值可由毛细管的有效长度除以相应的电泳保留时间获得。

离解过程: 当 A 穿过 B 并且两种物质实现分离后,第一个过程中生成的 C 物质开始离解,则可用下式表示为:

$$\begin{array}{lcl} & \xrightarrow{k_{\text{off}}} & \text{A} + \text{B} \\ t = t_1 & c_1 & a_1 \quad b_1 \\ t = t_2 & c_2 & a_2 \quad b_2 \\ t = t_3 & c_3 & a_3 \quad b_3 \end{array} \quad (6)$$

$t_2$ 、 $t_3$  分别为不同运行电压下 A 物质或 B 物质的出峰时间,可通过改变电压(保证 A 与 B 结合过程一致的前提下)获得。根据 $k_{\text{off}}$ 的定义<sup>[7]</sup>,其值为:

$$k_{\text{off}} = \frac{1}{t_2 - t_1} \ln \frac{c_1}{c_2}, \quad (7)$$

$$k_{\text{off}} = \frac{1}{t_3 - t_1} \ln \frac{c_1}{c_3}. \quad (8)$$

由于  $c_1$  这一临界值难以获得,所以将式(7)和(8)迭代推导出  $k_{\text{off}}$  的计算公式为:

$$k_{\text{off}} = \frac{1}{t_3 - t_2} \ln \frac{c_2}{c_3}. \quad (9)$$

根据假设条件 1(A 和 B 反应的结合数为 1:1)、质量守恒原理以及毛细管电泳中物质的峰高与浓度的关系  $h=\varepsilon c$  ( $h$  为峰高,  $\varepsilon$  为吸光系数,  $c$  为物质的浓度), C 物质的增加量与 A 或 B 物质的减少量相等, 因此  $c_2$ 、 $c_3$  的值可由两次电泳中 A 或 B 物质峰高( $h$ )的变化求得:

$$c_2 = \frac{h_{a0} - h_{a2}}{h_{a0}} a_0 \text{ 或 } c_2 = \frac{h_{b0} - h_{b2}}{h_{b0}} b_0, \quad (10)$$

$$c_3 = \frac{h_{a0} - h_{a3}}{h_{a0}} a_0 \text{ 或 } c_3 = \frac{h_{b0} - h_{b3}}{h_{b0}} b_0. \quad (11)$$

$h_{a0}$  对应于 A 物质浓度为  $a_0$  时的峰高,  $h_{a2}$ ,  $h_{a3}$ ,  $h_{b0}$ ,  $h_{b2}$  和  $h_{b3}$  代表的含义以此类推.

进而  $k_{\text{off}}$  的计算公式可更直观地表示为:

$$k_{\text{off}} = \frac{1}{t_3 - t_2} \ln \frac{h_{a0} - h_{a2}}{h_{a0} - h_{a3}} = \frac{1}{t_3 - t_2} \ln \frac{h_{b0} - h_{b2}}{h_{b0} - h_{b3}}. \quad (12)$$

综上所述, 相互作用体系的动力学参数  $k_{\text{on}}$ 、 $k_{\text{off}}$  可通过下述方法获得:

一是改变运行电压, 获得不同离解时间下 A 或 B 物质的出峰时间和峰高, 按式(12)获得  $k_{\text{off}}$ .

二是利用求得  $k_{\text{off}}$  和式(7)或式(8)求得  $c_1$ , 再利用式(5)求得  $k_{\text{on}}$ .

最后, 结合平衡常数  $K_b$  则可通过下式求得:

$$K_b = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}}. \quad (13)$$

### 3 实验部分

#### 3.1 仪器与试剂

自组装毛细管电泳仪(带有 0~30 kV 连续可调高压直流电源; 波长连续可调的紫外-可见吸收检测器); HW-2003 色谱工作站(南京千谱软件有限公司); 石英毛细管(总长度 56.5 cm, 有效长度 43.0 cm, 内径 50  $\mu\text{m}$ , 河北永年锐泽色谱器件有限公司).

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (AR, 重庆北碚化学试剂厂);  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (AR, 西安化学试剂厂); 西酞普兰草酸盐(纯度>98.5%, 重庆莱美药物技术有限公司馈赠); BSA(纯度>98%, 北京鼎国生物技术有限公司); 丙酮 (AR, 重庆川东化工集团有限公司化学试剂厂).

#### 3.2 实验方法

运行缓冲液: 20 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -20 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH = 7.0); 西酞普兰储备液和 BSA 储备液

均用缓冲液配置; 实验温度: 18 $^{\circ}\text{C}$ ; 运行电压: 测定  $h_{a2}$  和  $t_2$  时电压保持为 20 kV, 测定  $h_{a3}$  和  $t_3$  时为保持结合过程的一致, 先施加 20 kV 的电压 0.5 min, 后调整电压为 15 kV; 为了消除电压的变化对峰高的影响, 在实验中使用体积比为 20% 的丙酮溶液(用缓冲液配置)作为参比. 进样次序为: 20% 丙酮溶液-BSA-西酞普兰(测定  $h_{a0}$  时, BSA 区段被缓冲液区段所代替), 3 个区段的高差进样时间均为 20 s, 高度差均为 15 cm; 检测波长为 240 nm.

在利用时间比方法对  $k_{\text{off}}$  求解的验证中, 对于一特定浓度的西酞普兰与 BSA 相互作用体系, 电泳时先施加 20 kV 电压 0.5 min, 后分别设定电压为 20、15、12、10 kV, 其余电泳条件及操作与上述相同.

新毛细管在使用前用 0.1 mol  $\cdot \text{L}^{-1}$  NaOH、 $\text{H}_2\text{O}$  各冲洗 10 min, 最后用缓冲溶液冲洗 30 min. 每次电泳运行之间, 依次用 0.1 mol  $\cdot \text{L}^{-1}$  NaOH、 $\text{H}_2\text{O}$ 、缓冲液各冲洗毛细管 3 min 来消除由于蛋白质吸附造成的影响.

## 4 结果与讨论

### 4.1 动力学参数的测定

将西酞普兰储备液分别稀释为 7.00, 6.00, 5.00, 4.00, 3.00 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$ , 分别与 1.00 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  的 BSA 相互作用, 按照实验方法进行区段-区段毛细管电泳, 每个数据平行测定 3 次, 然后求平均值, 计算时采用与丙酮的相对峰高. 西酞普兰与 BSA 相互作用的电泳谱图如图 2 所示, 从图 2(a)中可获得参数  $h_{a0}$ , 图 2(b)和(c)为不同离解时间下西酞普兰与 BSA 的电泳谱图, 从中可以分别获得参数  $h_{a2}$ ,  $t_2$  和  $h_{a3}$ ,  $t_3$ , 所得的数据如表 1 所示(设公式中 A 物质为西酞普兰, B 物质为 BSA).

通过对 5 个不同浓度比值下西酞普兰与 BSA 的相互作用研究, 计算得  $k_{\text{off}}$  的平均值和标准偏差分别为  $1.19 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  和  $0.20 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ .

由于样品溶液中的西酞普兰和 BSA 是少量的, 由微量的溶质加入造成的溶液黏度及密度的差异可忽略不计. 采用  $\eta = 1.0 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ , 计算得西酞普兰、BSA 的进样长度均为 0.41 cm, 然后利用运行电压为 20 kV 时西酞普兰、BSA 的出峰时间  $t_a$  和  $t_b$  计算  $t_1$ , 并按计算步骤对  $k_{\text{on}}$  进行求解, 数据如表 2 所示, 其中计算  $c_1$  时采用的为表 1 计算所得的  $k_{\text{off}}$  的平均值.

通过对 5 个不同浓度比下西酞普兰与 BSA 的相互作用研究, 计算得  $k_{\text{on}}$  的平均值和标准偏差分别为

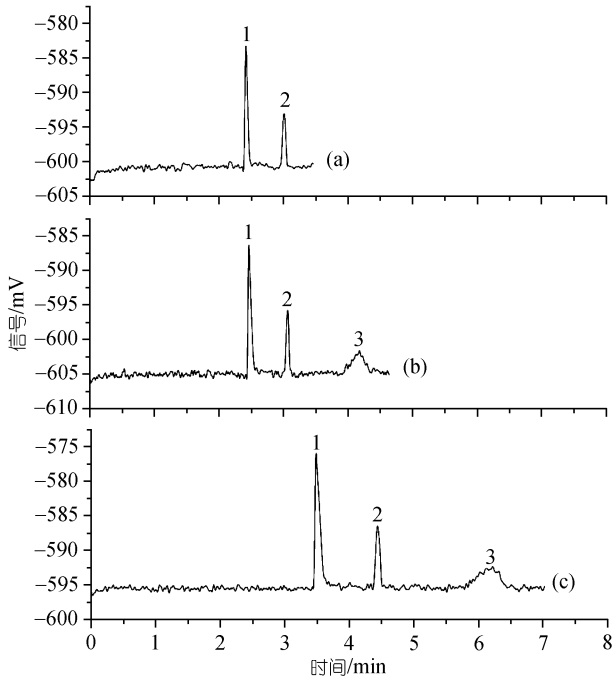


图2 西酞普兰与BSA相互作用的电泳谱图  
峰: 1, 西酞普兰; 2, 标记物丙酮; 3, BSA. 运行缓冲液: 20 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-20 mmol·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 7.0). 进样方式: 高差进样 15 cm×20 s. 进样次序: (a) 20%丙酮溶液-缓冲液-西酞普兰; (b)和(c), 20%丙酮溶液-BSA-西酞普兰. 运行电压: (a)和(b), 20 kV; (c), 先施加 20 kV 电压 0.5 min, 后调整电压为 15 kV

3.01×10<sup>2</sup> L·mol<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>和 0.58×10<sup>2</sup> L·mol<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>. 进而通过式(13)求得  $K_b$  为 2.54×10<sup>5</sup> L·mol<sup>-1</sup>.

表1 区段-区段毛细管电泳中动力学参数  $k_{off}$  的求解

| $a_0/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ | $h_{a_0}$ | $h_{a_2}$ | $t_2/\text{s}$ | $h_{a_3}$ | $t_3/\text{s}$ | $k_{off}/\text{s}^{-1}$ |
|-------------------------------------|-----------|-----------|----------------|-----------|----------------|-------------------------|
| 1.50                                | 1.68      | 1.37      | 152.4          | 1.38      | 210.3          | $0.99\times10^{-3}$     |
| 2.00                                | 1.79      | 1.47      | 145.5          | 1.49      | 215.9          | $1.09\times10^{-3}$     |
| 2.50                                | 1.87      | 1.58      | 149.8          | 1.60      | 210.6          | $1.23\times10^{-3}$     |
| 3.00                                | 2.22      | 1.93      | 150.4          | 1.95      | 218.2          | $1.15\times10^{-3}$     |
| 3.50                                | 2.42      | 2.10      | 146.9          | 2.15      | 205.2          | $1.48\times10^{-3}$     |

表2 区段-区段毛细管电泳中动力学参数  $k_{on}$  的求解

| $a_0/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ | $t_2/\text{s}$ | $b_0/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ | $t_b/\text{s}$ | $t_1/\text{s}$ | $c_1/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ | $c_2/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ | $k_{on}$         |
|-------------------------------------|----------------|-------------------------------------|----------------|----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------|
| 1.50                                | 152.4          | 0.50                                | 243.1          | 7.7            | 0.34                                | 0.28                                | $2.21\times10^2$ |
| 2.00                                | 145.5          | 0.50                                | 245.9          | 6.7            | 0.43                                | 0.36                                | $2.88\times10^2$ |
| 2.50                                | 153.9          | 0.50                                | 256.7          | 6.8            | 0.46                                | 0.38                                | $3.00\times10^2$ |
| 3.00                                | 150.4          | 0.50                                | 254.1          | 7.0            | 0.48                                | 0.40                                | $3.16\times10^2$ |
| 3.50                                | 146.9          | 0.50                                | 247.3          | 6.8            | 0.49                                | 0.41                                | $3.81\times10^2$ |

表3 不同离解时间下相应的浓度参量的变化

| 运行电压/kV                                | —    | 20     | 15     | 12     | 10     | —        |
|----------------------------------------|------|--------|--------|--------|--------|----------|
| 离解时间/s                                 | 0.00 | 147.10 | 203.80 | 255.00 | 301.34 | $\infty$ |
| 相对峰高                                   | 1.53 | 1.58   | 1.60   | 1.62   | 1.63   | 1.87     |
| C 的浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 0.45 | 0.38   | 0.36   | 0.34   | 0.32   | 0.00     |
| 对比浓度( $p/q$ )                          | 1.00 | 0.84   | 0.80   | 0.76   | 0.71   | 0.00     |

4.2 用时间比的方法对  $k_{off}$  的求解进行验证

由于  $k_{on}$  和  $K_b$  是以  $k_{off}$  值间接计算获得, 因此对  $k_{off}$  求解的准确性直接关系着整套数据的准确性, 为此, 研究中采用“时间比法”对  $k_{off}$  求解的准确性进行验证.

所谓“时间比法”就是根据一系列反应时间及相应浓度的数据, 首先将浓度转变为对比浓度( $p/q$ ,  $p<q$ ), 即将浓度除以初始浓度而变为无因次. 每一个对比浓度的值, 对应于一个反应级数就有一个确定的  $\tau_{p/q}$  值, 而  $\tau_{p/q}$  代表当对比浓度反应到达  $p/q$  时所需的对比时间. 不同对比时间的比值, 即时间比表征了反应级数的特性, 进而可以根据时间比的方法确定反应级数, 另外, 还可以进一步对动力学参数进行求解. 对于一级反应来说, 反应的速率常数可由一个  $\tau_{p/q}$  值除以相应的反应时间求得.

在上述  $k_{off}$  的求解中, 测定了两个离解时间所对应的浓度变化. 为采用时间比法, 我们进一步测定了 5.00 mmol·L<sup>-1</sup> 西酞普兰与 1.00 mmol·L<sup>-1</sup> BSA 相互作用时的离解过程, 得到的数据如表 3.

通过对运行电压的调节, 不同离解时间下西酞普兰的相对峰高可从谱图中获得, 对应的 C 物质的浓度由式(10)或式(11)计算获得. 离解时间无穷大时, C 物质离解完全, 西酞普兰的相对峰高等于  $h_{a_0}$  ( $a_0 = 2.50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). 离解时间为 0.00 s 时的相对峰高及

C 的浓度值是根据离解时间( $y$ )与相对峰高( $h$ )间的趋势线方程  $y = 4778.9 \cdot \ln(h) - 2041.3$  ( $R^2 = 0.9886$ )求得, 趋势线方程正确反应了  $k_{\text{off}}$  求解公式中离解时间与浓度之间的对数关系. 各对比浓度是以离解时间为 0.00 s 时 C 物质的浓度为初始浓度计算获得, 进一步可根据离解时间( $y$ )与对比浓度( $x$ )间的趋势线方程  $y = -899.2 \cdot \ln(x) - 1.0$  ( $R^2 = 0.9961$ ), 求得对比浓度分别为 3/4 和 1/2 时的离解时间为:  $t_{3/4} = 257.70$  s,  $t_{1/2} = 622.32$  s, 进而求得  $\tau_{3/4}/\tau_{1/2} = t_{3/4}/t_{1/2} = 0.414$ . 与文献[6]第 6 页表 1.3 中的数值对照, 所求得的  $t_{3/4}$  与  $t_{1/2}$  的比值 0.414 与文献中一级反应的  $\tau_{3/4}/\tau_{1/2}$  特性值 0.415 接近, 说明西酞普兰与 BSA 结合物的离解过程符合一级反应的规律. 查得一级反应的  $\tau_{3/4} = 0.287$ , 利用  $\tau_{3/4}$  值除以相应的反应时间求得  $k_{\text{off}}$  为:

$$k_{\text{off}} = \tau_{3/4}/t_{3/4} = 1.11 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1},$$

该值与 ppKCE 求得的  $k_{\text{off}}$  的平均值  $1.19 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  基本一致, 说明本文建立的方法及所得结果准确可靠.

### 4.3 讨论

#### 4.3.1 西酞普兰与 BSA 的相互作用

对于西酞普兰与 BSA 相互作用后的结合物, 从实验谱图中并没有看到单独且明显的峰, 推测其包含在 BSA 的峰中, 因为 BSA 的分子量很大, 而在 ppKCE 中, 西酞普兰穿过 BSA 时二者发生动态的结合, 结合物的淌度较 BSA 变化不大, 在分离条件下较难实现 BSA 与结合物的分别检测. 但结合物的检测与否对计算并没有影响, 利用西酞普兰与 BSA 作用后峰高的变化即可推算出结合物的量, 进而对动力学参数进行求解.

#### 4.3.2 进样次序的确定

在本实验中, 使用标记物的目的是排除电压变

化对峰高的影响. 由于在实验条件下, 西酞普兰、丙酮、BSA 分别带正、中、负电荷, 所以迁移速率的大小次序为: 西酞普兰 > 丙酮 > BSA. 因此进样时先注入丙酮, 然后注入 BSA, 最后注入西酞普兰, 既能够使丙酮的加入达到校正西酞普兰峰高的作用, 又不影响西酞普兰与 BSA 的相互作用.

#### 4.3.3 假设条件的验证

参照文献, 如果要满足当区带 A 穿过区带 B 时, 只发生 A、B 两种物质的相互结合; 当区带 A 和 B 分开后, 只发生 C 物质的离解反应的假设条件, 即区带 A 穿过区带 B 时 C 物质的离解可以被忽略,  $t_{\text{pass}}$  需要远小于 C 物质离解的特征时间  $t_{\text{char}} = 1/k_{\text{off}}$ . 根据本研究计算所得的  $k_{\text{off}}$  值 ( $1.19 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) 可得  $t_{\text{char}} = 1/k_{\text{off}} = 840.34$  s, 则有  $t_{\text{pass}} = t_1 \approx 7 \ll t_{\text{char}}$ , 即区带 B 穿过区带 A 时 C 物质的离解可以被忽略, 满足了假设条件. 这说明选取的相互作用分子对体系中实际的相互作用过程与我们所模拟的过程是吻合的, 从而说明研究方法及其计算可靠.

### 5 结论

本文建立了一种新的 ppKCE 方法, 可同时对快速动力学参数  $k_{\text{on}}$  和  $k_{\text{off}}$  以及结合常数  $K_b$  进行求解. 采用该方法对西酞普兰与 BSA 的相互作用体系进行了研究, 测定了其相应的动力学参数和结合常数. 并且采用时间比法对实验结果进行了验证, 二者所得的数据相互吻合, 说明该方法准确、可靠. 新的 ppKCE 方法在实验操作和计算上都更为简单, 避免了复杂的数学建模及其对信号的要求, 降低了实验对毛细管电泳分离度及检测灵敏度的要求, 并将区段-区段动力学毛细管电泳的应用领域拓展到小分子与蛋白间的亲和相互作用研究.

### 参考文献

- 李锐, 任海平, 孙艳亭, 姚英艳, 卢奎, 马丽. 小分子与生物大分子间非共价相互作用分析方法研究进展. 分析化学, 2006, 34(12): 1801—1806
- Aleksenko S S, Hartinger C G, Semenova O, Meelich K, Timerbaev A R, Keppler B K. Characterization of interactions between human serum albumin and tumor-inhibiting amino alcohol platinum (II) complexes using capillary electrophoresis. J Chromat A, 2007, 1155: 218—221 [\[DOI\]](#)
- Martínez-Gómez M A, Carril-Avilés M M, Sagrado S, Villanueva-Camañas R M, Medina-Hernández M J. Characterization of antihistamine-human serum protein interactions by capillary electrophoresis. J Chromat A, 2007, 1147: 261—269 [\[DOI\]](#)
- Okhonin V, Petrov A P, Berezovski M, Krylov S N. Plug-plug kinetic capillary electrophoresis: Method for direct determination of rate constants of complex formation and dissociation. Anal Chem, 2006, 78: 4803—4810 [\[DOI\]](#)
- Petrov A, Okhonin V, Berezovski M, Krylov S N. Kinetic capillary electrophoresis (KCE): A conceptual platform for kinetic homogeneous affinity methods. J Am Chem Soc, 2005, 127: 17104—17110 [\[DOI\]](#)
- H.J. 比特里希, D. 哈伯兰德, G. 尤斯特. 化学动力学计算方法. 北京: 高等教育出版社, 1987. 1—38
- 傅献彩, 沈文霞, 姚天扬. 物理化学. 第四版. 北京: 高等教育出版社, 2002. 712—714