

泛昔洛韦解离常数和结合常数的测定

陈毅挺, 苏碧玲, 黄露, 林棋

(闽江学院 化学与化学工程系, 福建 福州 350108)

摘要: 采用紫外分光光度法, 在 225 nm 与 305 nm 波长处测得泛昔洛韦的解离常数 pK_a 均为 3.8。在含有泛昔洛韦的 pH 值为 7.0 的 $Na_2HPO_4 - KH_2PO_4$ 缓冲溶液中加入牛血清白蛋白, 以双倒数公式法测定二者的结合常数。结果表明, 牛血清白蛋白与泛昔洛韦形成了 1:4 的配合物, 其结合常数是 4.51×10^6 L/mol。方法简便, 结果可靠。

关键词: 泛昔洛韦; 紫外分光光度法; 解离常数; 牛血清白蛋白; 结合常数

中图分类号: O657.32

文献标识码: B

文章编号: 1006-3757(2011)01-0001-05

泛昔洛韦 (Famciclovir, FCV) 结构见图 1, 其作为一种新型抗病毒药, 生物利用度高, 对单纯疱疹、水痘、带状疱疹病毒等均具有较强的抗病毒活性, 还具有减少疱疹后神经疼痛症状、缓解皮肤疱疹的胃肠道并发症、缩短病程等特点^[1-2]。

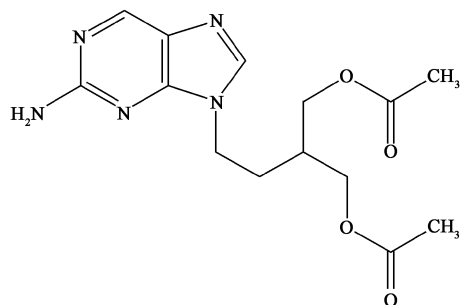


图1 泛昔洛韦结构式

Fig. 1 Structural formula of FCV

药物在生物体内的吸收与其溶解度有着密切的关系。探讨药物的解离常数及其与血清白蛋白的结合常数, 可为从分子水平上研究药物的吸收情况、及其药物与受体结合作用提供重要信息。用于药物解离常数和结合常数测定的方法有: 平衡透析法^[4]、毛细管电泳法^[5-8]、纸电泳法^[9]、荧光光谱法^[10-13]、电导法^[14]、伏安法^[15-16]等。本文采用紫外分光光度法测定泛昔洛韦的解离常数、与牛血清白蛋白

(BSA) 的结合常数及结合位点数, 方法简便可行, 所需仪器简单。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

泛昔洛韦 (标准品) 购自中国药品生物制品检定所, 牛血清白蛋白 (BSA) 购自国药集团化学试剂有限公司, 磷酸二氢钾 (分析纯)、磷酸氢二钠 (分析纯) 购自上海久亿化学试剂有限公司, 实验用水均为去离子水。

紫外可见分光光度计 (UV-2550, 日本岛津公司), 电子天平 (BS214D, 北京赛多利斯仪器系统有限公司), 酸度计 (868, 美国奥立龙公司), 旋涡混合器 (XW-80A, 上海精科有限公司)。

1.2 实验原理

1.2.1 解离常数的测定

对于一元弱酸 HA, 在不考虑离子强度的影响时, 其电离常数 K_a 可表示为^[17]:

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

式中 $[HA]$ 为 HA 的浓度, $[H^+]$ 、 $[A^-]$ 分别为 HA 电离后 H^+ 与 A^- 的浓度。设在 HA 未发生电离和电离完全时, 体系在某一固定波长下的吸光度分别为 A_{HA} 和 A_{A^-} ; 当 HA 发生部分电离时, 体系的吸

收稿日期: 2010-10-25; 修订日期: 2010-12-01.

基金项目: 福建省青年人才创新项目 (2008F3081, 2010J05029)、福建省教育厅科技项目 (JA10222, JB09188)、食品安全分析与检测教育部重点实验室 (福州大学) 开放课题 (FS10002, FS10005) 与福建省高校杰出青年科研人才培育计划资助。

作者简介: 陈毅挺 (1978-), 男, 博士, 主要从事化学传感器研究. fjcyt@foxmail.com

光度为 A . 将 A_{HA} 和 A_{A^-} 的计算式代入方程 (1) 并整理得^[18]:

$$\text{p}K_{\text{a}} = -\log\left[\frac{A_{\text{HA}} - A}{A - A_{\text{A}^-}}\right] + \text{pH} \quad (2)$$

由方程 (2) 可知, 当 $A = \frac{A_{\text{HA}} + A_{\text{A}^-}}{2}$ 时, $\text{p}K_{\text{a}} = \text{pH}$. 因此, 可测定不同 pH 下的吸光度 A , 并以 A 对 pH 值作图, 即可得 $\text{p}K_{\text{a}}$.

1.2.2 结合常数的测定

固定牛血清白蛋白的浓度, 改变泛昔洛韦的浓度, 依据双倒数公式^[19] (见式 3) 计算泛昔洛韦与牛血清白蛋白的结合常数.

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{a \cdot K \cdot [Q]} + \frac{1}{a} \quad (3)$$

式 (3) 中, $[Q]$ 为所加入的泛昔洛韦的浓度, ΔA 为某个固定波长 (本实验选择 305 nm) 处混合前单个物质吸光度总和与混合后体系吸光度的差值, a 为常数. 以 ΔA^{-1} 对 $[Q]^{-1}$ 作图, 结合常数 K 可通过所得线性方程的截距与斜率的比值求得.

1.3 实验方法

1.3.1 解离常数的测定

用酸度计精密配制浓度为 0.20 mol/L pH 1.0 ~ 8.0 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS). 精密移取 1 mL 泛昔洛韦贮备液 (6.0×10^{-5} mol/L) 8 份, 分别置于 8 个 10 mL 容量瓶中, 分别使用 pH 1.0 ~ 8.0 的磷酸盐缓冲溶液定容. 以各自对应的空白溶液做参比, 依次对上述配制好的溶液进行紫外光谱扫描.

1.3.2 结合常数的测定

将含有不同浓度泛昔洛韦的 BSA 溶液. 以各对应的空白溶液 (含 BSA) 作参比, 将上述配制好的溶液依次进行紫外光谱扫描.

2 结果和讨论

2.1 泛昔洛韦解离常数的测定

测定了不同 pH 下泛昔洛韦在 220 ~ 360 nm 的紫外吸收光谱, 结果如图 2 所示. 当缓冲液的 pH 值小于 2.0 时, 泛昔洛韦的紫外吸收光谱行为一致, 可看作仅以分子形态存在. 当 pH 值为 2.0 ~ 5.0 之间时, 泛昔洛韦在 220 ~ 235 nm 的吸光度随着 pH 值的增大而减小, 在 280 ~ 320 nm 的吸光度随着 pH 值的增大而增大. 当缓冲液的 pH 值大于 6.0 后, 泛昔洛韦在各波长下的吸光度均未发生明显变化, 可看作仅以解离离子形态存在.

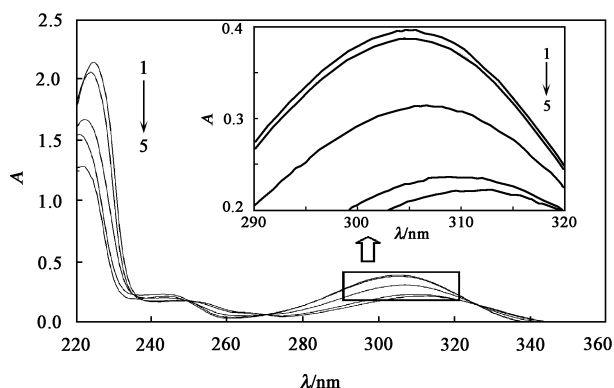


图 2 不同 pH 值下泛昔洛韦的紫外吸收光谱

Fig. 2 UV - Vis absorption

spectra of FCV under different pH values

[FCV] = 6.0×10^{-6} mol/L, buffer: PBS (0.20 mol/L), 1. pH 2.0; 2. pH 3.0; 3. pH 4.0; 4. pH 5.0; 5. pH 6.0.

一般应选择分子型、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^[20]. 因此, 选择 225 nm 与 305 nm 作为检测波长, 考察了泛昔洛韦的吸光度随着 pH 值的变化情况, 结果如图 3 所示.

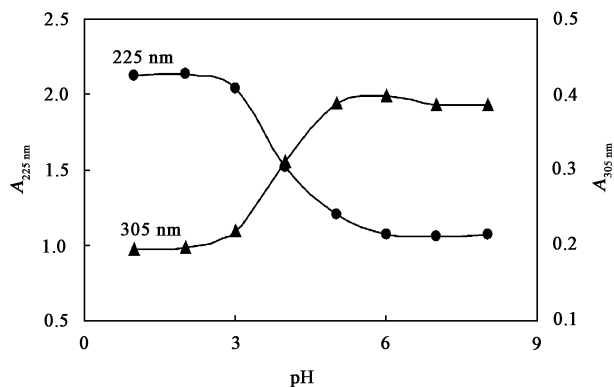


图 3 A - pH 曲线图

Fig. 3 A - pH curves

[FCV] = 6.0×10^{-6} mol/L, buffer: PBS (0.20 mol/L, pH = 1.0 ~ 8.0).

根据 1.2.1 部分中的式 (2), 取 $\frac{A_{\text{HA}} + A_{\text{A}^-}}{2}$ 值处所对应的 pH 值即为 $\text{p}K_{\text{a}}$ 值, 通过 225 nm 与 305 nm 的 A - pH 曲线 (见图 3) 均可得出泛昔洛韦的解离常数为 3.8.

2.2 泛昔洛韦结合常数的测定

由牛血清白蛋白和泛昔洛韦混合液的紫外吸收

光谱(图 4)可见,牛血清白蛋白在 225 nm 附近有较强的吸收,而在 305 nm 波长处的吸收很弱,且泛昔洛韦和牛血清白蛋白的吸收相互干扰较小,因此选择 305 nm 为测定波长.同时,为了接近生物体环境,分析时溶液的酸度值控制在 7.0.

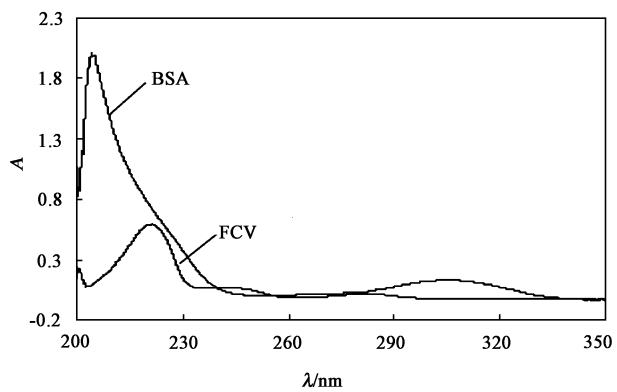


图 4 牛血清白蛋白和泛昔洛韦的紫外可见吸收光谱
Fig. 4 UV - Vis absorption spectra of BSA and FCV
[BSA] = 1.00×10^{-5} mol/L, [FCV] = 1.86×10^{-6} mol/L, buffer: PBS (0.20 mol/L, pH = 7.0).

采用与试样中 BSA 浓度相同的溶液作为参比溶液,测定了泛昔洛韦和牛血清白蛋白作用后的紫外吸收光谱,结果如图 5 所示.

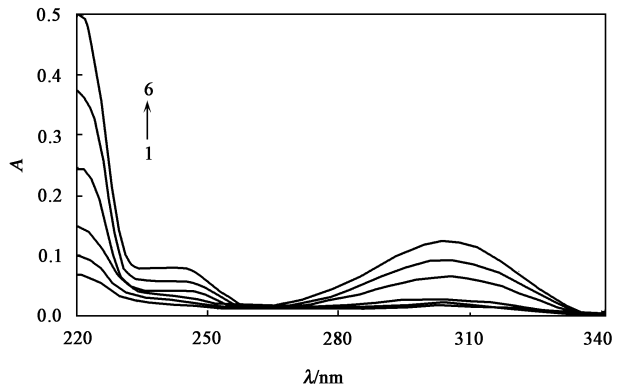


图 5 泛昔洛韦和牛血清白蛋白作用后的紫外可见吸收光谱
Fig. 5 UV - Vis absorption spectra of FCV and BSA
1. 7.11×10^{-7} mol/L; 2. 7.56×10^{-7} mol/L; 3. 1.07×10^{-6} mol/L; 4. 1.25×10^{-6} mol/L; 5. 1.64×10^{-6} mol/L; 6. 1.86×10^{-6} mol/L, [BSA] = 1.0×10^{-5} mol/L, buffer: PBS(0.20 mol/L, pH = 7.0).

从图 5 可见,加入 BSA 后泛昔洛韦的吸收光谱呈现规律性的变化,并有等吸收点,证明混合液中有 2 个纯物质发生了反应,而且光谱吸收值的变化是

由于反应引起了物质摩尔吸光系数的改变.当固定牛血清白蛋白浓度,改变泛昔洛韦的浓度时,二元体系吸光值要比单独牛血清白蛋白与泛昔洛韦的吸光值之和小,表明二者结合后吸光值发生变化.按照 1.2.2 中介绍,以 ΔA^{-1} 对 $[Q]^{-1}$ 作图,结果如图 6 所示.在波长 305 nm 下,吸光度变化值的倒数与所加入的泛昔洛韦的摩尔浓度的倒数在 $7.41 \times 10^5 \sim 4.22 \times 10^6$ L/mol 成良好的线性关系,相应的回归方程为 $\Delta A^{-1} = 7.26 \times 10^{-6} \times [Q]^{-1} + 32.75$, 相关系数 R 为 0.996, 则二者结合常数 K 为 4.51×10^6 L/mol.

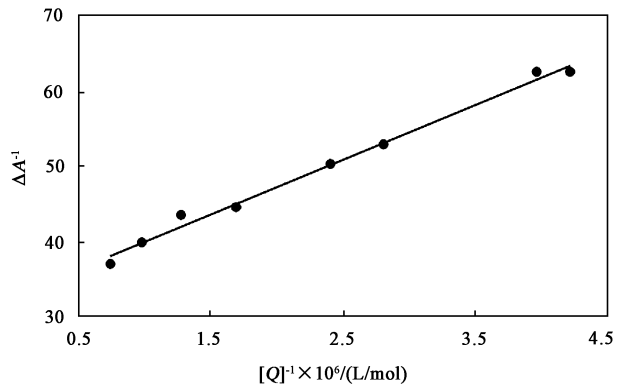


图 6 ΔA^{-1} 与 $[Q]^{-1}$ 的关系
Fig. 6 Relationship between ΔA^{-1} and $[Q]^{-1}$

2.3 结合位点数的测定

在 pH 为 7.0 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ 的缓冲溶液中,固定牛血清白蛋白的用量 (1.0×10^{-5} mol/L),改变泛昔洛韦的用量,在 305 nm 处得牛血清白蛋白和不同浓度的泛昔洛韦作用的吸光度差值变化与泛昔洛韦浓度的关系,结果如图 7 所示.

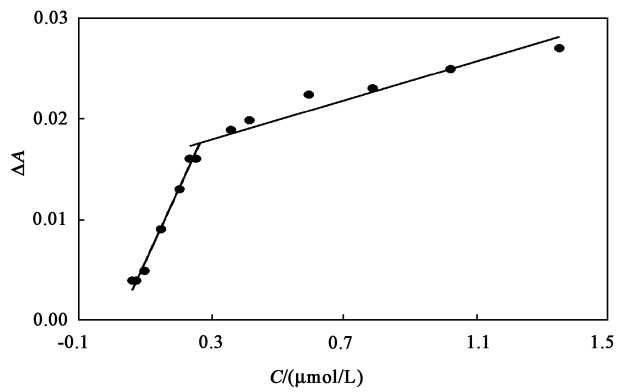


图 7 ΔA 随泛昔洛韦浓度不同的变化
Fig. 7 Change of ΔA with different concentrations of FCV

在本实验的缓冲体系中,由于 pH 值大于 BSA 的等电点,BSA 带一定的负电荷,而泛昔洛韦在 pH 为 7.0 的环境下同样带负电荷,因此,泛昔洛韦和 BSA 的结合主要不是非特异性的静电结合,而是存在着较强的特异性结合作用。从图 7 可以看出:在波长 305 nm 下,吸光度变化值与所加入的泛昔洛韦的摩尔浓度在 0.06 ~ 0.24 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.25 ~ 1.35 $\mu\text{mol/L}$ 均成良好的线性关系,两条直线的交叉点的横坐标约为 0.25,所以牛血清白蛋白与泛昔洛韦形成 1:4 的配合物,即结合位点数 m 为 4。

3 结论

采用紫外可见分光光度法测定了泛昔洛韦解离常数及其与 BSA 的结合常数,得到 pK_a 为 3.8,结合常数为 $4.51 \times 10^6 \text{ L/mol}$,结合位点数为 4。该方法是药物与蛋白相互作用研究中较易实现的方法,而且也拓展了紫外光谱法的应用。研究的结果将有助于从分子水平上进一步揭示了泛昔洛韦在体内的代谢、吸收情况,对了解药物在体内的存在状态、运输、吸收、代谢及药理作用具有重要意义。当然,若能使用诸如液相色谱等技术,预计可以获得更好的选择性,更高的灵敏度与准确度。

参考文献:

- [1] 龙启才,冯霞,王建华. 泛昔洛韦片的剂量耐受性、药动学与生物利用度[J]. 中国药房,2000,11(1):30-31.
- [2] 金义翠. 新一代抗病毒药物法昔洛韦[J]. 广州医药,2002,33(6):6-8.
- [3] Zhou N, Liang Y Z, Wang P. 18 β - Glycyrrhetic acid interaction with bovine serum albumin[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2007, 185 (2-3): 271-276.
- [4] 郭宾,李川. 药物与血浆蛋白结合的药理学基础及其研究进展[J]. 中国临床药理学和治疗学,2005,10(3):241-253.
- [5] Beckers J L, Everaerts F M, Ackermans M T. Determination of absolute mobilities, pK values and separation numbers by capillary zone electrophoresis[J]. Journal of Chromatography A, 1991, 537: 407-428.
- [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] Cleveland J J, Benko M H, Gluck S J, *et al.* Automated pK_a determination at low solute concentration by capillary electrophoresis [J]. Journal of Chromatography A, 1993, 652(2): 301-308.
- [8] Mrestani Y, Neubert R, Munk A, *et al.* Determination of dissociation constants of cephalosporins by capillary zone electrophoresis[J]. Journal of Chromatography A, 1998, 803(1-2): 273-278.
- [9] Waldron - Edward D. The micro determination of acid and base dissociation constants by paper electrophoresis [J]. Journal of Chromatography A, 1965, 20: 556-562.
- [10] 马贵斌,高飞,任斌知,等. 荧光法研究药物分子与人血清白蛋白的结合作用[J]. 化学学报,1995,53(12):1193-1197.
- [11] 孟建新,周建英,涂华民,等. 荧光法测定 Ce^{3+} 与 tRNA 的结合常数[J]. 中山大学学报(自然科学版),1998,37(2):21-25.
- [12] 张国文,陈秀霞. 荧光法研究 3 种黄酮化合物与牛血清白蛋白的结合作用[J]. 南昌大学学报(工科版),2010,32(2):140-144.
- [13] 童裳伦,叶荣民,张全,等. S - 异丙甲草胺与小牛胸腺 DNA 的相互作用[J]. 高等学校化学学报,2010,31(5):905-910.
- [14] 靳朝辉,张凤宝,张国亮. 电导法确定离子交换树脂中反离子的解离度[J]. 高校化学工程学报,2004,18(6):671-675.
- [15] 王桂芬,李春哲,林小华,等. 泛昔洛韦与牛血清白蛋白相互作用的伏安行为研究[J]. 分析试验室,2007,26(7):75-78.
- [16] 孙伟,焦奎. 电化学法研究蛋白质和茜素红 S 的相互作用[J]. 分析化学,2002,30(3):312-314.
- [17] 武汉大学. 分析化学[M]. 北京:高等教育出版社,第五版,2006:112-114.
- [18] 赵秀丽,陈大为,罗铁凡,等. 紫外分光光度法测定丁香酚的电离常数[J]. 沈阳药科大学学报,2003,20(6):445-447.
- [19] 吕桂英,刘引,吕鉴泉. 光度法研究诺氟沙星金属络合物与鲐鱼精 DNA 的相互作用[J]. 化学与生物工程,2008,25(4):39-42.
- [20] 陈金蓉,刘家琴,罗英,等. 大豆黄素解离常数的分光光度法测定[J]. 绵阳师范学院学报,2008,27(2):64-67.

Determination of Dissociation Constant and Binding Constant of Famciclovir

CHEN Yi – ting, SU Bi – ling, HUANG Lu, LIN Qi

(*Chemistry and Chemical Engineering Department of Minjiang University, Fuzhou 350108, China*)

Abstract: Both the dissociation constants of famciclovir obtained were 3.8 using ultraviolet spectrophotometry with the wavelengths at 225 nm and 305 nm. Bovine serum albumin was added to a $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ buffer solution (pH 7.0) with famciclovir. The binding constant was measured by the double – reciprocal analysis. The results showed that bovine serum albumin and famciclovir formed a 1:4 complex, and the binding constant obtained was $4.51 \times 10^6 \text{ L/mol}$. This method is simple and reliable.

Key words: famciclovir; ultraviolet spectrophotometry; dissociation constant; bovine serum albumin; binding constant

Classifying number: O657.32

会议通知

关于举办《第十三届国际电分析化学会议》的通知

《第十三届国际电分析化学会议》经中国科学院批准,并受中国化学会委托,由中国科学院长春应用化学研究所电分析化学国家重点实验室举办。会议将于 2011 年 8 月 19 日至 22 日在长春应化所举办。会议将特邀国际著名电分析化学家参加,会议语言为英语,欢迎参加。如提出报告,请交英文摘要一份(截止日期:2011 年 5 月 15 日)。联系人:张柏林 研究员,吉林省长春市人民大街 5625 号,邮编:130022。电话/传真:0431 – 85262430,电子邮件:blzhang@ciac.jl.cn,随后寄上录用通知(国内来宾注册费 600 元)。最新详细信息请登录 <http://iseac.ciac.jl.cn/>

《第十三届国际电分析化学会议》组委会

