

文章编号:1673-9469(2009)04-0092-04

## 紫外-可见分光光度法对灯盏乙素的电离常数的研究

孟晓彩,秦身钧,梁丽静

(河北工程大学 理学院,河北 邯郸 056200)

**摘要:**用紫外-可见分光光度法研究了灯盏乙素的电离常数。配制了一系列 pH 值的灯盏乙素溶液并在灯盏乙素的特征波长处分别测定它们的吸光度,以 368 nm 处的吸收峰作为分析波长,测出灯盏乙素一级电离常数  $pK_{a1} = 8.52$ ;以 365 nm 作为分析波长,测出灯盏乙素的二级电离常数  $pK_{a2} = 11.20$ ;以 326 nm 作为分析波长,测出灯盏乙素的三级电离常数  $pK_{a3} = 12.56$ 。该方法简单、易行,操作方便。

**关键词:**灯盏乙素;紫外-可见分光光度法;电离常数

**中图分类号:** TM282

**文献标识码:** A

## Study on the ionization constant of scutellarin with UV - Visible spectrometry

MENG Xiao-cai, QIN Shen-jun, LIANG Li-jing

(College of Science, Hebei University of Engineering, Hebei Handan 056038, China)

**Abstract:** In this paper, UV - Visible spectrometry was employed to study the ionization constant of scutellarin. The standard solution of series pH value were prepared and the absorbance was measured at suitable wavelenths. Then the ionization constant is obtained according to the change of absorbance. The first dissociation constant was 8.52 when 368 nm was selected as the analytical wave length; The second dissociation constant was determined to be 11.20 using 365 nm as the analytical wave length; The third dissociation constant was 12.56 using 326 nm. This way is proved to be simple, applicable and easily operated.

**Key words:** scutellarin; UV - Visible spectrometry; ionization constant

灯盏花是中医临床常用的一味中药,性味辛、微苦、温,归心、肝经,具有祛风散寒、活血通络止痛之功效,主要用于治疗风寒痹痛、中风瘫痪、胸痹心痛、牙痛、感冒<sup>[1]</sup>。灯盏花素是从灯盏花中提取的黄酮类有效成分,主要是灯盏乙素(scutellarin)和少量甲素的混合物<sup>[2,3]</sup>。灯盏乙素占灯盏花素的90%以上,是主要药效成分。灯盏乙素又名黄芩素苷、野黄芩苷,具有改善脑血循环,增加脑血流量,降低血管阻力和抗血小板凝聚的作用;临床应用广泛,主要用于心脑血管疾病,如闭塞性脑血管所致后遗症、冠心病,心绞痛等<sup>[4,5]</sup>。它的化学结构如图1所示。从结构中可看出,灯盏花素含有多个羟基和一个糖苷键,因而呈现酸碱两性。酸碱性是药物重要的化学性质,因为许多药物进入细胞和其它膜的过程取决于这些药物的物

理化学性质及其电离常数,所以通过电离常数的测定可以预测其在体内的最佳吸收部位和吸收分数,因此,作为制剂处方前研究工作,具有重要的实际意义。然而目前,未见有关灯盏乙素电离常数研究的报导。本文采用紫外-可见分光光度检测法,测定了灯盏乙素的电离常数,为该类药物的研究及应用提供了方便、准确的分析方法。

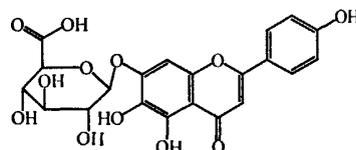


图1 灯盏乙素的分子结构

Fig.1 Molecular structure of scutellarin

收稿日期:2009-09-15

作者简介:孟晓彩(1983-),女,河北邯郸人,助教,硕士,从事生物无机化学方面的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

UV - 2501PC 分光光度计 (Shimadzu); 828 型 pH/ISE 测试仪 (Orion)。

灯盏乙素 (中国药品生物制品检定所): 准确称取 4.40 mg 灯盏乙素溶于 100 mL 乙醇中, 制得灯盏乙素浓度为  $44.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的储备液, 用时用水适当稀释; Britton - Robinson 缓冲溶液 (HAc、 $\text{H}_3\text{PO}_4$ 、 $\text{H}_3\text{BO}_3$  浓度分别为  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); 氯化钠溶液 ( $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); 实验用水为二次去离子水; 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 实验方法

在一系列 10 mL 容量瓶里分别加入灯盏乙素, Britton - Robinson, 氢氧化钠溶液, 氯化钠溶液, 定容至刻度, 摇匀, 配制一系列 pH 值的灯盏乙素溶液, 选择合适波长为测定波长, 设定测定波长的原则是: 选择随 pH 值的改变溶液的吸光度变化较大的波长处测量。在室温下用 1cm 石英比色皿, 以紫外—可见分光光度法测定各个 pH 值的灯盏乙素溶液的吸光度值。根据吸光度的变化趋势, 计算灯盏乙素的  $pK_a$  值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 分光光度法测定电离常数的原理<sup>[6]</sup>

设有一元弱酸 HB, 存在下述解离平衡:



设 HB 和  $\text{B}^-$  在某波长下均有吸收, 根据吸光度加和性原理, 有

$$A = A_{\text{HB}} + A_{\text{B}} = \epsilon_{\text{HB}}[\text{HB}] + \epsilon_{\text{B}}[\text{B}]$$

$$= \epsilon_{\text{HB}} c_{\text{HB}} \frac{[\text{H}^+]}{K_a + [\text{H}^+]} + \epsilon_{\text{B}} c_{\text{HB}} \frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]} \quad (2)$$

在 pH 足够低时, HB 完全以分子型 HB 存在,  $c_{\text{HB}} = [\text{HB}]$ ,  $A_{\text{HB}} = \epsilon_{\text{HB}} c_{\text{HB}}$ ; 在 pH 足够高时, HB 完全以  $\text{B}^-$  的型体存在,  $c_{\text{HB}} = [\text{B}]$ ,  $A_{\text{B}} = \epsilon_{\text{B}} c_{\text{HB}}$ ; 在适当的 pH 时, HB 与  $\text{B}^-$  共存, 溶液吸光度可表示为

$$A = A_{\text{HB}} \frac{[\text{H}^+]}{K_a + [\text{H}^+]} + A_{\text{B}} \frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]} \quad (3)$$

由此可导出

$$pK_a = \text{pH} - \lg \frac{A_{\text{HB}} - A}{A - A_{\text{B}}} \quad (4)$$

根据上式, 只要测得  $A_{\text{HB}}$ 、 $A_{\text{B}}$  和适当 pH 时的 A 值, 就可以计算出  $K_a$  值。

### 2.2 灯盏乙素一级电离常数的测定

固定灯盏乙素的浓度, 改变溶液的酸度, 分别测定了灯盏乙素在近中性条件下的紫外吸收光谱, 如图 2 所示。

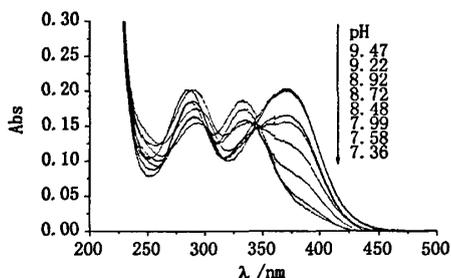


图 2 近中性条件下灯盏乙素的紫外吸收光谱

Fig. 2 Absorption spectra of scutellarin in neutral solutions,  $c_{\text{scutellarin}} = 4.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NaCl}} = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

由图 2 可见, 随着 pH 值的升高, 332 nm 处的吸收峰逐渐降低, 368 nm 处出现新的吸收峰, 344 nm 处形成明显的等色点。等色点的形成说明物质的形体发生了变化, 灯盏乙素溶液随着 pH 值的变化对应着质子的解离, 即羟基质子的解离。碱性条件下 368 nm 处吸光度比较大且相对稳定, 酸性条件下吸光度较小, 近中性条件下吸光度变化很大。

表 1 灯盏乙素一级解离常数  $K_{a1}$  的计算

Tab. 1 Calculation of dissociation constant  $K_{a1}$  of scutellarein ( $A_{\text{HB}} = 0.0637$ ,  $A_{\text{B}} = 0.2029$ ,  $\lambda = 368 \text{ nm}$ ,  $25^\circ\text{C}$ )

pH	A	$\lg \left[ \frac{A_{\text{HB}}}{A - A_{\text{B}}} \right]$	$pK_{a1}$	平均值
7.36	0.0637	—	—	
7.58	0.0654	-1.90784	9.487841	
7.99	0.0904	-0.62464	8.614642	
8.48	0.1275	-0.07255	8.552551	8.5247
8.72	0.1552	0.282903	8.437097	
8.92	0.1649	0.425397	8.494603	
9.22	0.1998	1.642496	7.577504	
9.47	0.2029	—	—	

由于该条件下灯盏乙素在 368nm 处吸收最强, 所以本实验选择 368nm 处的吸收峰作为分析波长, 通过测量相同浓度不同 pH 值下的一系列灯盏乙素的吸光度可得, 随着 pH 值的增大, 368nm

处吸光度逐渐增大,当 pH 为 9.47 以上时,吸光度达到一个比较恒定的水平,说明灯盏乙素的第一个质子在 pH 为 9.47 左右时时解离完成,  $A_B = 0.2029$ 。在 pH 值为 7.36 以下达到完全质子化,  $A_{HB} = 0.0637$ 。根据公式(4),测出灯盏乙素一级解离常数  $pK_{a1} = 8.52$ ,见表 1。

2.3 灯盏乙素二级电离常数的测定

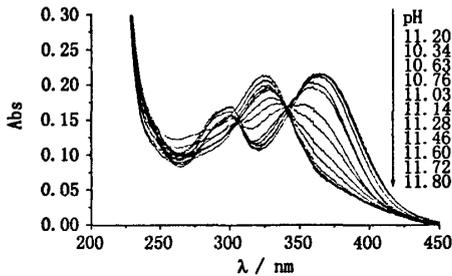


图3 碱性条件下灯盏乙素的紫外吸收光谱

Fig.3 Absorption spectra of scutellarin in neutral solutions,  $c_{scutellarin} = 4.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NaCl}} = 0.1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

固定灯盏乙素溶液的浓度,改变溶液的酸度,测量了灯盏乙素在碱性条件下的吸收光谱,见图 3。随着 pH 值的升高,365 nm 处的吸收峰逐渐降低,325 nm 处出现新的吸收峰,341 nm 处形成明显的等色点。

表 2 灯盏乙素二级解离常数  $K_{a2}$  的计算

Tab.2 Calculation of dissociation constant  $K_{a2}$  of scutellarein

( $A_{HB} = 0.2134$ ,  $A_B = 0.0780$ ,  $\lambda = 365 \text{ nm}$ ,  $25^\circ\text{C}$ )

pH	A	$\lg[(A_{HB} - A)/(A - A_B)]$	$pK_{a2}$	平均值
10.34	0.2134	—	—	
10.63	0.2101	-1.60239	12.23239	
10.76	0.2007	-0.98504	11.74504	
11.14	0.1589	-0.17155	11.31155	
11.28	0.1378	0.101821	11.17818	11.2046
11.46	0.1122	0.471154	10.98885	
11.6	0.0965	0.800643	10.79936	
11.7	0.0831	1.407374	10.31263	
11.8	0.0780	—	—	

由于在该条件下灯盏乙素在 365 nm 处吸收最强,所以本实验选择 365 nm 作为分析波长,通过测量相同浓度不同 pH 值的一系列灯盏乙素的吸光度,可知随 pH 值的升高,390nm 处吸光度逐渐减弱,当  $\text{pH} > 11.7$  时,吸光度达到一恒定的值,说明

灯盏乙素在  $\text{pH} = 11.7$  左右时解离完成,  $A_B = 0.0780$ ;当  $\text{pH} < 10.63$  时,第二个质子以完全质子化的形式存在,  $A_{HB} = 0.2134$ 。根据上述原理即可求得灯盏乙素的二级电离常数  $pK_{a2} = 11.20$ ,见表 2。

2.4 灯盏乙素三级电离常数的测定

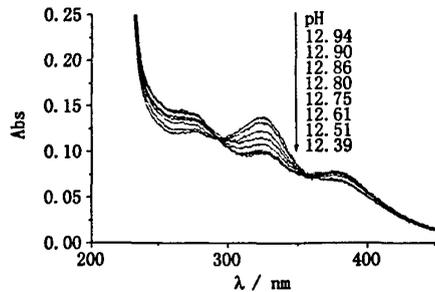


图4 强碱性条件下灯盏乙素的紫外吸收光谱

Fig.4 Absorption spectra of scutellarin in neutral solutions,  $c_{scutellarin} = 2.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NaCl}} = 0.1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

固定灯盏乙素溶液的浓度,改变溶液的酸度,测量了灯盏乙素在强碱性条件下的吸收光谱,见图 4。随着 pH 值的升高,326nm 处的吸收峰逐渐降低,271nm、381nm 处出现新的吸收峰,295nm、354nm 处形成明显的等色点。

由图 4 可知当 pH 到了 12.9 以上时,吸光度达到一恒定的值,说明灯盏乙素在  $\text{pH} = 12.9$  左右时第三个羟基解离完成,  $A_B = 0.1007$ ;当 pH 在 12.61 以下时,第三个质子以完全质子化的形式存在,  $A_{HB} = 0.1390$ 。根据公式(4),以 326nm 作为分析波长,测出灯盏乙素的三级电离常数  $pK_{a3} = 12.56$ ,见表 3。

表 3 灯盏乙素三级解离常数  $K_{a3}$  的计算

Tab.3 Calculation of dissociation constant  $K_{a3}$  of scutellarein

( $A_{HB} = 0.1390$ ,  $A_B = 0.1007$ ,  $\lambda = 326 \text{ nm}$ ,  $25^\circ\text{C}$ )

pH	A	$\lg[(A_{HB} - A)/(A - A_B)]$	$pK_{a3}$	平均值
12.94	0.1390	—	—	
12.9	0.1329	-0.72253	13.62253	
12.86	0.1232	-0.15353	13.01353	
12.8	0.1150	0.224875	12.57512	12.55505
12.69	0.1082	0.613489	12.07651	
12.61	0.1008	2.582063	10.02794	
12.51	0.1007	—	—	

## 2.5 灯盏乙素电离常数的讨论

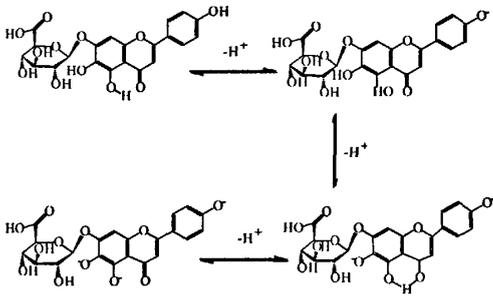


图5 灯盏乙素的电离过程

Fig.5 Ionization process of scutellarin

灯盏乙素母体上有三个羟基,但是三者羟基电离强弱不同。羰基的存在,虽然使得苯环A上4,4'位的电子云密度降低,导致4,4'-OH上的O与苯环 $p-\pi$ 共轭加强,易电离出H质子,但是4-OH与邻位的羰基相邻,会形成路易斯酸碱而变成分子内氢键闭合的结构,4-OH因为受到了束缚,此时比一般酚羟基的酸性还弱,所以,对于灯盏乙素来说,如图5,4'-OH在 $pH = 8.56$ 左右先发生了质子离解,生成的 $4'-O^-$ 本身又影响了第二个酚羟基的离解,5-OH的电离常数为11.20,生成的 $4'-O^-$ 、 $5-O^-$ 本身又影响了第三个酚羟基的离解,4-OH的电离常数为12.56。

## 3 结论

本文以紫外—可见分光光度法研究了灯盏乙素的电离常数,测得灯盏乙素三级电离常数分别为的 $pK_a$ 为8.56,11.20,12.56。该方法简单,方便,准确性高,为药物在体内的吸收、分布、代谢和发生效用等的研究提供了一个有效的药物动力学研究方法。

## 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] 张人伟, 张元玲, 王杰生, 等. 灯盏花黄酮类成分分离鉴定[J]. 中草药, 1988, 19(5): 199-201.
- [3] 张峻, 李雪松, 张卫东. 中药灯盏花化学成分与药理活性研究进展[J]. 药学实践杂志, 2002, 20(2): 103-107.
- [4] 邵云, 平其能, 操锋, 等. 灯盏花素新制剂、新剂型及其结构修饰研究进展[J]. 中国天然药物, 2007, 5(3): 229-234
- [5] 王桂霞. 灯盏花素药理及临床应用[J]. 时珍国医国药, 1999, 10(8): 639.
- [6] 孟晓彩. 中药草豆蔻、黄芩活性成分的光谱性质及荧光分析法研究[D]. 石家庄: 河北师范大学, 2008.

(责任编辑 马立)

# 紫外-可见分光光度法对灯盏乙素的电离常数的研究

作者: [孟晓彩](#), [秦身钧](#), [梁丽静](#), [MENG Xiao-cai](#), [QIN Shen-jun](#), [LIANG Li-jing](#)  
作者单位: [河北工程大学, 理学院, 河北, 邯郸, 056200](#)  
刊名: [河北工程大学学报\(自然科学版\)](#)   
英文刊名: [JOURNAL OF HEBEI UNIVERSITY OF ENGINEERING \(NATURAL SCIENCE EDITION\)](#)  
年, 卷(期): 2009, 26 (4)  
被引用次数: 1次

## 参考文献(6条)

1. [国家药典委员会](#) [中华人民共和国药典](#) [期刊论文]-北京:化学工业出版社 2005
2. [张人伟](#); [张元玲](#); [王杰生](#) [灯盏花黄酮类成分分离鉴定](#) [期刊论文]-[中草药](#) 1988 (05)
3. [张峻](#); [李雪松](#); [张卫东](#) [中药灯盏花化学成分与药理活性研究进展](#) [期刊论文]-[药学实践杂志](#) 2002 (02)
4. [邵云](#); [平其能](#); [操锋](#) [灯盏花素新制剂、新剂型及其结构修饰研究进展](#) [期刊论文]-[中国天然药物](#) 2007 (03)
5. [王桂霞](#) [灯盏花素药理及临床应用](#) [期刊论文]-[时珍国医国药](#) 1999 (08)
6. [孟晓彩](#) [中药草豆蔻、黄芩活性成分的光谱性质及荧光分析法研究](#) [期刊论文]-[石家庄:河北师范大学](#) 2008

## 引证文献(1条)

1. [熊华斌](#), [阿新祥](#), [杨欣雨](#), [陈毅坚](#), [陈孟生](#), [陈名红](#) [正交设计在灯盏乙素提取优化中的应用](#) [期刊论文]-[北方园艺](#) 2013 (6)

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_hbjzkjxyxb200904023.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_hbjzkjxyxb200904023.aspx)