

2011-02-28

Interaction of the Epirubicin Hydrochloride with Bovine Serum Albumin and Its Application

Hong-fen CHENG

Yong ZHANG

Jie-qiong SONG

Zeng-qiao WANG

Recommended Citation

Hong-fen CHENG, Yong ZHANG, Jie-qiong SONG, Zeng-qiao WANG. Interaction of the Epirubicin Hydrochloride with Bovine Serum Albumin and Its Application[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2011 , 17(1): Article 15.

DOI: 10.61558/2993-074X.2820

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol17/iss1/15>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

盐酸表阿霉素与牛血清白蛋白的相互作用和 伏安分析

程红芬, 张 勇*, 宋洁琼, 王增巧

(山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006)

摘要: 应用线性扫描技术研究盐酸表阿霉素的电化学行为. 结果表明, 在 pH 6.80 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 盐酸表阿霉素有一较灵敏的还原峰, $E_{pc} = -0.34$ V (vs. SCE). 加入牛血清白蛋白(BSA)后, 盐酸表阿霉素的还原峰电流明显下降. 据此, 建立了 BSA 的电化学测定法. 在最佳实验条件下, $1.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ mol · L⁻¹ 范围内, BSA 浓度与盐酸表阿霉素的峰电流下降值 Δi_p 呈线性关系 ($R = 0.9973$), BSA 检出限达 8.05×10^{-10} mol · L⁻¹. 盐酸表阿霉素与 BSA 的结合比为 1, 结合常数 β 为 3.04×10^6 L · mol⁻¹.

关键词: 盐酸表阿霉素; 牛血清白蛋白(BSA); 玻碳电极

中图分类号: O651.1

文献标识码: A

表阿霉素(Epirubicin, EPI)是柔红霉素4'位羟基差向异构化的产物^[1], 属广谱抗肿瘤药物, 已在临床上广泛使用^[2]. 血清白蛋白是人血浆中最丰富的载体蛋白, 能与多种内源性物质作用^[3], 堪称药物疗效的重要载体^[4]. 目前, 药物与 BSA 相互作用已有较多报道, 涉及荧光光谱法^[5]、共振光散射法^[6]、电化学法^[7]等. 电化学检测因简便、快速和成本低廉而倍受重视. 本文应用电化学法研究表阿霉素与牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)相互作用, 建立测定 BSA 的一种新方法.

1 实验

1.1 仪器与试剂

LK 2005 型电化学工作站(天津兰力科); 三电极体系: 饱和甘汞参比电极(SCE), 铂丝对电极和玻碳工作电极($\phi: 4$ mm).

1.0×10^{-4} mol · L⁻¹ 盐酸表阿霉素标准储备液(海正药业, 质量分数 > 99.2%), 1.0×10^{-5} mol · L⁻¹ BSA 溶液(Sigma 公司, 分子量: 68000), pH 6.8 Tris-HCl 缓冲溶液.

其他试剂均为分析纯, 实验用水为二次去离子水. 标准溶液存暗处、备用.

1.2 电极处理

将玻碳电极用 Al₂O₃ 粉末和水混合于绸布上抛光成镜面, 然后依次用稀硝酸、水及乙醇超声处理, 二次水洗净、备用.

1.3 测试方法

于比色管(10 mL)中加入 0.75 mL (0.10 mol · L⁻¹) Tris-HCl 缓冲溶液, 0.50 mL 盐酸表阿霉素 (1.0×10^{-4} mol · L⁻¹) 及不同浓度牛血清白蛋白溶液, 用水稀释至刻度、摇匀. 使用 LK 2005 型电化学工作站测定循环伏安曲线, 电位区间: 0.25 ~ -0.60 V, 记录峰电流和峰电位.

2 结果与讨论

2.1 条件优化

1) 电解质

分别尝试以 0.1 mol · L⁻¹ 的 NaCl、KCl、Na₂SO₄ 及 Tris-HCl-EDTA (简称 TE) 缓冲液 (pH 8.0)、Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0)、HAc-NaAc (pH 7.0) 缓冲液、Na₂HPO₄-KH₂PO₄ (pH 7.0) 缓冲液为支持电解质, 测定盐酸表阿霉素的伏安响应. 结果表明仅在 Tris-HCl 缓冲液中盐酸表阿霉素有一个可逆、灵敏的氧化还原峰, 故选取该缓冲

液为支持电解质。

2) 起始电位

固定盐酸表阿霉素的浓度,从 0.00 至 0.50 V 依次递增选择起始电位. 测试循环伏安曲线. 当起始电位为 0.25 V 时,峰电流最大,增大或减少起始电位,峰电流均减小. 实验中取 0.25 V 为宜.

3) 缓冲溶液酸度及用量

固定盐酸表霉素浓度,改变 Tris-HCl(0.1 mol · L⁻¹)缓冲溶液的 pH 值与用量. 在 pH 6.80, 用量 0.75 mL 时其峰电流可达到最大值. pH 增大,峰电位负移.

4) 扫描速率

图 1 示出,在 75 ~ 550 mV · s⁻¹ 扫速范围测定不同扫速(v)下,盐酸表阿霉素的循环伏安曲线. 从图看出, v 与峰电流 i_p 呈线性关系,且峰电位 E_{pc} 随电流增加而正移. 回归方程: $i_p = 3.728 + 31.338v$ ($R = 0.9988$),表明盐酸表阿霉素反应受吸附控制. 考虑到测试灵敏度,选取 150 mV · s⁻¹ 为宜.

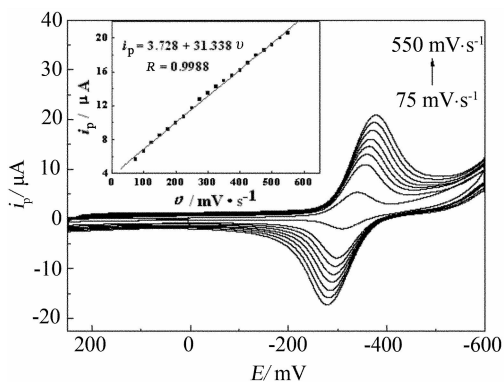


图 1 不同扫速下盐酸表阿霉素的循环伏安曲线

Fig. 1 Cyclic voltammograms of the epirubicin hydrochloride at different scan rates (inset: plot of $i_p \sim v$)

2.2 盐酸表阿霉素的线性范围及检出下限

图 2 给出不同浓度的盐酸表阿霉素在玻碳电极上 0.25 ~ -0.60 V 电位区间的线性扫描曲线. 如图,盐酸表阿霉素的峰电流 i_{pc} 与浓度 ($1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 呈线性关系. 线性回归方程: $i_p = 2.6564 + 0.7023 \times 10^6 C$ ($R = 0.9968$),其检出下限可达 $3.40 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.3 精密度

由 10 份 $5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸表阿霉素溶液

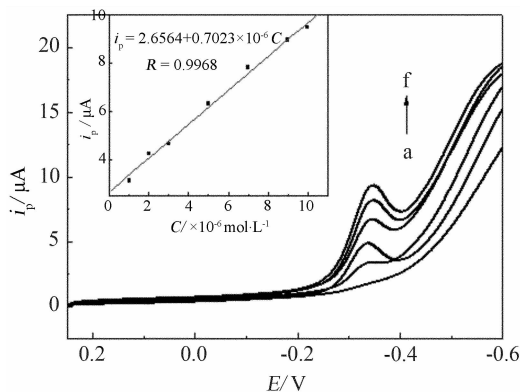


图 2 不同浓度的盐酸表阿霉素线性扫描曲线

Fig. 2 Linear sweep voltammograms of the epirubicin hydrochloride with different concentrations concentration of epirubicin hydrochloride (a ~ f) / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$: 0; 1.0; 3.0; 5.0; 7.0; 9.0

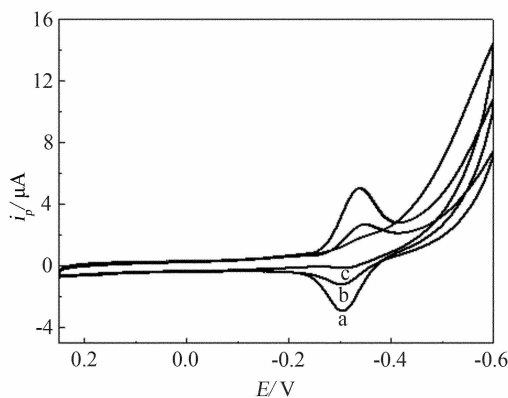


图 3 盐酸表阿霉素、BSA 及其混合液的循环伏安曲线

Fig. 3 Cyclic voltammograms of the epirubicin hydrochloride, BSA and the epirubicin hydrochloride-BSA solution a. $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ epirubicin hydrochloride, b. $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ epirubicin hydrochloride + BSA $5.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, c. $5.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA

作平行检测,得出峰电流的 RSD 为 2.30%.

2.4 盐酸表阿霉素与 BSA 的相互作用

1) 盐酸表阿霉素和 BSA 的混合

图 3 示出盐酸表阿霉素、BSA 及其混合溶液的循环伏安曲线. 从图看出,BSA 本身没有电化学活性(曲线 c),盐酸表阿霉素有一灵敏的还原峰(a), $E_{pc} = -0.34 \text{ V}$. 而加入 BSA,则其混合液的峰电流下降(b),这可能是由于盐酸表阿霉素与 BSA 发生了反应.

图 4 给出上述混合液的循环伏安曲线. 如图可见,在固定盐酸表阿霉素浓度下增加 BSA 浓度,峰

电流 i_{pc} 逐渐减小, 且其 Δi_p 与 BSA 浓度变化呈正比(回归方程为: $\Delta i_p = 0.1818 C_{BSA} + 1.7233, R = 0.9952$). 此结果足以表明盐酸表阿霉素可与 BSA 复合并形成无电化学生活性的复合物, 减少前者游离的盐酸浓度, 致使其还原峰电流下降.

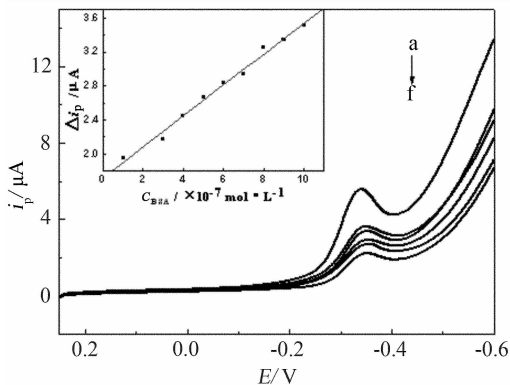


图 4 盐酸表阿霉素和 BSA 混合液的线性伏安曲线(盐酸表阿霉素 $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Fig. 4 Linear sweep voltammograms of the epirubicin hydrochloride-BSA system (concentrations of epirubicin hydrochloride; $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) C_{BSA} (a ~ f) / $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$: 0; 1.0; 3.0; 5.0; 7.0; 9.0

2) 表面活性剂的影响

实验表明: 十二烷基磺酸钠对盐酸表阿霉素有增敏作用, 使其峰电流增大, 灵敏度提高; 加入四甲基氯化铵, 峰电流无明显变化; 但两性表面活性剂咪唑啉或非离子表面活性剂明胶, 均使体系峰电流下降. 这说明盐酸表阿霉素是以阳离子的形式被部分吸附在电极表面的.

3) 峰电流下降值与 BSA 浓度及检出下限

固定盐酸表阿霉素和十二烷基磺酸钠的浓度 ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 改变 BSA 浓度, 发现在 $1.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 盐酸表阿霉素的峰电流降低值 Δi_{pc} 与 BSA 浓度呈线性关系, 线性回归方程为: $\Delta i_p = 2.1889 + 3.5053 \times 10^6 C_{BSA}$ ($R = 0.9973$), 检出限可达 $8.05 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

4) BSA 精密度与回收率

以 10 份 $3.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 溶液作检测, 得相对标准偏差为 1.03%.

固定盐酸表阿霉素浓度, 配制 6 份已知浓度的 BSA 溶液. 作加标回收测定, 结果见表 1. BSA 回收率在 95.03% ~ 102.18% 之间, 符合常规分析要求.

表 1 BSA 回收率

Tab.1 The recovery of the BSA

Original/ $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Added/ $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Found/ $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Recovery/%
3.023		6.990	99.18
2.903	4.000	6.872	99.23
2.838		6.639	95.03
4.085		8.172	102.18
4.203	4.000	8.052	96.23
4.328		8.230	97.55

5) 结合常数和结合比

由直线法^[8] 计算盐酸表阿霉素和 BSA 的结合常数和结合比, 公式如下:

$$\frac{1}{\Delta i_p} = \frac{1}{\Delta i_{max}} + \frac{1}{\Delta i_{max}\beta[BSA]^n}$$

式中, Δi_p 为 BSA 加入前后的峰电流变化值, Δi_{max} 为峰电流变化的最大值. 若盐酸表阿霉素与 BSA 只形成一种简单的复合物, 即 $1/\Delta i_p \sim 1/[BSA]^n$ (结合比 $n = 1, 2, 3$) 变化应为一一直线, 从直线截距和斜率可求结合常数 β . 测试表明, 盐酸表阿霉素与 BSA 可形成 1: 1 的复合物, 结合比 $n = 1$, 结合常数 $\beta 3.04 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$.

3 结 论

在 pH 6.80 Tris-HCl 缓冲液中盐酸表阿霉素有一灵敏的还原峰 $E_{pc} = -0.34 \text{ V}$ (vs. SCE), 十二烷基磺酸钠 (浓度为 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 阴离子表面活性剂对盐酸表阿霉素有增敏作用. 体系加入 BSA 后, 盐酸表阿霉素的还原峰电流降低, 其 Δi_p 与 BSA 浓度呈线性关系. 据此, 建立 BSA 的电化学测定法, 盐酸表阿霉素与 BSA 的结合比为 $n = 1$, 结合常数 β 为 $3.04 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$.

参考文献 (References):

[1] Ren Haiyang (任海洋), Li Zhiyu (李志裕), Song Bingsheng (宋炳生). The research progress of anthracycline [J]. China Pharmacist (中国药师), 2002, 5(2): 115-116.

[2] Marfa Sereno, Antonella Brunello, Alberto Chiappori, et al. Cardiac toxicity: old and new issues in anti-cancer drugs [J]. Clin Transl Oncol, 2008, 10: 35-46.

[3] National Acopoeia Committee (国家药典委员会). The

- People's Republic of China Pharmacopoeia [M]. Beijing: Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2000, 807-809.
- [4] Liang Yanqiu (梁彦秋), Zang Shuliang (臧树良), Zhao Xue (赵雪). Interaction of ceftazidime with bovine serum albumin [J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory (光谱实验室), 2009, 26(6): 1638-1642.
- [5] Zhang Guowen, Zhao Nan, Hu Xing, et al. Interaction of alpinetin with bovine serum albumin: Probing of the mechanism and binding site by spectroscopic methods [J]. Spectrochimica Acta Part A, 2010, 76: 410-417.
- [6] Zhao Xiaohui (赵小辉), Huang Chengzhi (黄承志). A study on the interaction of isamin blue with BSA by resonance light scattering measurements [J]. Journal of Southwest China Normal University (西南师范大学学报), 2006, 31(3): 70-75.
- [7] Peng Zhen (彭贞), Cheng Lehua (程乐华), Lu Guanghan (陆光汉). Electrochemical study of rhodamine B interacting with bovine serum albumin (BSA) [J]. Journal of Analytical Science (分析科学学报), 2006, 22(3): 318-320.
- [8] Yang Pin (杨频). Introduction to bioinorganic chemistry [M]. Xi'an: Xi'an Jiaotong University Press (西安交通大学出版社), 1991.

Interaction of the Epirubicin Hydrochloride with Bovine Serum Albumin and Its Application

CHENG Hong-fen, ZHANG Yong*, SONG Jie-qiong, WANG Zeng-qiao

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: The linear sweep technique was used to study the electrochemical behavior of epirubicin hydrochloride. The results showed that there was a sensitive reduction peak at -0.34 V (vs. SCE) in pH 6.80 Tris-HCl buffer. When the BSA was added, the value of the reduction peak was reduced deeply. Accordingly, a new electrochemical determination method of BSA was established. Under the optimum conditions, the decrease of the reduction peak currents of epirubicin hydrochloride were proportional to the concentrations of BSA in the range of $1.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ mol \cdot L $^{-1}$ ($R = 0.9973$). The detection limit of the BSA was 8.05×10^{-10} mol \cdot L $^{-1}$. And the binding constant β of the epirubicin hydrochloride and BSA was 3.04×10^6 L \cdot mol $^{-1}$ with the ratio of 1.

Key words: epirubicin hydrochloride; bovine serum albumin (BSA); glassy carbon electrode