

FLT3 抑制剂 CHMFL-FLT3-122 解离常数的测定

赵文婷, 狄斌* (中国药科大学药学院, 南京 211198)

摘要: 目的 测定 CHMFL-FLT3-122 的 2 个解离常数。方法 将 CHMFL-FLT3-122 溶于一系列的不同 pH 的缓冲溶液中, 并在合适的波长处采用 UV 分别测定吸光度并计算其 pK_{a1} 值; 以不同比例的乙腈-水(30 : 70、40 : 60、50 : 50、60 : 40) 为溶剂配制不同浓度(0.009, 0.013, 0.017 mol·L⁻¹)的 CHMFL-FLT3-122 溶液, 用盐酸溶液滴定, 利用非对数滴定法(Benet 法)经数学计算推算出其 pK_{a2} 值。结果 CHMFL-FLT3-122 存在 2 个解离常数, 其 pK_{a1} 值为 3.87±0.14, pK_{a2} 值为 8.12。结论 采用 UV 和非对数滴定法对 CHMFL-FLT3-122 的解离常数进行测定, 方法简单快速, 准确可靠, 可为其制剂的处方设计、质量标准的研究提供参考。

关键词: CHMFL-FLT3-122; 解离常数; 紫外分光光度法; 非对数滴定法

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)07-1002-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.07.015

引用本文: 赵文婷, 狄斌. FLT3 抑制剂 CHMFL-FLT3-122 解离常数的测定[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(7): 1002-1006.

Determination of Dissociation Constants of FLT3 Inhibitor CHMFL-FLT3-122

ZHAO Wenting, DI Bin* (College of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the two dissociation constants of CHMFL-FLT3-122. **METHODS** Dissolve CHMFL-FLT3-122 in a series of different pH values buffer solutions and the absorbance was measured at appropriate wavelengths by UV to calculate the pK_{a1} . Different proportions of acetonitrile-water mixtures(30 : 70, 40 : 60, 50 : 50, 60 : 40) were used to prepare different concentrations of CHMFL-FLT3-122 solutions(0.009, 0.013, 0.017 mol·L⁻¹) which were titrated by hydrochloric acid solution and the pK_{a2} was calculated by non-logarithmic titration method(Benet method). **RESULTS** The pK_{a1} of CHMFL-FLT3-122 was 3.87±0.14 and the pK_{a2} of CHMFL-FLT3-122 was 8.12. **CONCLUSION** The determination of the dissociation constants of CHMFL-FLT3-122 by UV and Non-logarithmic titration method is simple, rapid, accurate and reliable. It can be a reference for the prescription design of preparations and the research of quality standard.

KEY WORDS: CHMFL-FLT3-122; dissociation constants; UV; non-logarithmic titration method

FMS 样酪氨酸激酶 3(FMS-like tyrosine kinase 3, FLT3)是一种 III 型受体酪氨酸激酶, 在造血细胞和淋巴细胞的增殖、分化、凋亡过程中发挥关键作用。FLT3 的异常激活与一系列恶性血液疾病如急性髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)、急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)和慢性髓性白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)的发生发展以及预后密切相关, 研究表明, 超过 1/3 的 AML 患者伴有 FLT3 的异常激活^[1], 其中 FLT3 蛋白的近膜结构域的内部串联重复序列突变(FLT3-ITD)是 AML 中最主要的突变之一。CHMFL-FLT3-122 是一种新合成的 FLT3 激酶抑制剂, 结构式见图 1。该抑制剂对 AML 中的 FLT3-ITD 阳性的 FLT3 激酶自磷酸化及下游信号通路具有较好的抑制作用, 并且能有效使细胞周期停滞, 诱导此类细胞凋亡。

在临床前动物实验中已证明该化合物可以有效地阻滞 FLT3-ITD 突变肿瘤在小鼠体内的增长^[2]。

解离常数是关系到药物溶解度与 pH 值之间的重要理化常数, 对药物的分离纯化、色谱分析处方工艺筛选及研究药物的体内代谢过程等具有重要的指导意义^[3]。CHMFL-FLT3-122 作为一种新型潜在治疗 FLT3-ITD 阳性 AML 的候选药物, 其解离常数国内外均无报道, 测定其解离常数可为其新制剂的处方设计开发、质量标准研究提供参考。一般测定药物解离常数的方法有电位滴定法、分光光度法、电导法、毛细管电泳法等^[4]。CHMFL-FLT3-122 结构中有 2 个含氮的碱性基团, 一个为嘧啶环上的氨基, 一个为脂肪叔胺, 理论上二级解离。嘧啶环上的氨基碱性很弱, 无明显滴定突跃, 难以通过电位滴定法对其 pK_{a1} 进行测定, 但因为连有嘧啶环, 且双离子型(CHMFL-

作者简介: 赵文婷, 女, 硕士生 Tel: 18502548026 E-mail: lepolaris_zwt@163.com

*通信作者: 狄斌, 男, 博士, 教授, 博导 Tel:

(025)83271316 E-mail: dibin@cpu.edu.cn

FLT3-122 的共轭酸)和一级解离离子型紫外吸收差异较大,因此可以通过 UV 对 CHMFL-FLT3-122 嘧啶环上的氨基的 pK_{a1} 进行测定;脂肪叔胺几乎无紫外吸收,无法通过 UV 获得该基团的 pK_{a2} ,而叔胺具有较强的碱性,虽 CHMFL-FLT3-122 难溶于水,但易溶于乙腈,因此可以通过电位滴定法测定其在不同比例的乙腈-水混合溶剂中的解离常数,再应用一定的数学方法来得到在纯水中的解离常数。本研究分别用 UV 和非对数滴定法(Benet 法)对 CHMFL-FLT3-122 的 pK_{a1} 和 pK_{a2} 进行测定。

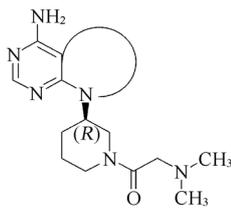


图 1 CHMFL-FLT3-122 化学结构式
Fig. 1 Chemical structure of CHMFL-FLT3-122

1 仪器与试剂

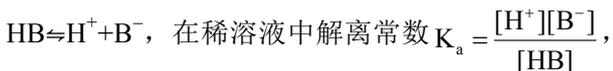
UV-2450 紫外可见分光光度计(日本 Shimadzu); FE-20 型 pH 计、XS105DU 电子天平购自瑞士 Mettler Toledo。

CHMFL-FLT3-122 对照品(自制,纯度 99.42%,批号:122-20160401);磷酸二氢钾(国药集团,分析纯)、氯化钾(西陇化工,分析纯)用于配制缓冲溶液(称取 KH_2PO_4 13.625 g, KCl 111.808 g 加入超纯水溶解后定容至 4 L,使之形成 KH_2PO_4 浓度为 $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\mu=0.4$ 的缓冲液);盐酸(国药集团,分析纯);氢氧化钠(西陇化工,分析纯);乙腈(TEDIA,色谱纯);实验用水为超纯水。

2 方法

2.1 CHMFL-FLT3-122 一级解离常数 pK_{a1} 的测定

有机弱酸、弱碱性药物在介质中可发生电离,以一元有机弱酸为例,在水中达到电离平衡:



两边取负对数得:

$$pK_a = pH + \log \frac{[HB]}{[B^-]} \quad (1)$$

其中,HB 为共轭酸, B^- 为共轭碱,如果 HB 和 B^- 均有紫外吸收,紫外吸收光谱又有明显的差

异,就可以用 UV 测定 pK_a 值。测定时,可取待测药物,配制 3 种浓度相同的溶液,通过调节溶液 pH 值,使溶液①中的药物部分以 HB,部分以 B^- 的形式存在(部分解离);溶液②中的药物仅以 HB 的形式存在(未解离);溶液③中的药物仅以 B^- 的形式存在(完全解离);设溶液①②③中药物的浓度分别为 C ,溶液①中 HB 的浓度为 C_{HB} , B^- 的浓度为 C_B 。 A 、 A_{HB} 、 A_B 分别为在一定波长处溶液①②③的吸光度。如果 HB 与 B^- 的紫外吸收均符合吸收定律,那么:

$$\begin{aligned} \frac{A - A_B}{A_{HB} - A} &= \frac{(\epsilon_{HB}C_{HB} - \epsilon_B C_B) - \epsilon_B C}{\epsilon_{HB}C - (\epsilon_{HB}C_{HB} + \epsilon_B C_B)} \\ &= \frac{\epsilon_{HB}C_{HB} - \epsilon_B C_{HB}}{\epsilon_{HB}C_B - \epsilon_B C_B} = \frac{C_{HB}(\epsilon_{HB} - \epsilon_B)}{C_B(\epsilon_{HB} - \epsilon_B)} = \frac{C_{HB}}{C_B} \end{aligned}$$

将其代入(1)中则可以得到:

$$pK_a = pH + \log \frac{A - A_B}{A_{HB} - A} \quad (2)$$

即可计算出药物的 pK_a 值。其中(2)式中 pH 值为溶液①的 pH 值^[5]。

因此,根据上述原理,先配制一份 CHMFL-FLT3-122 储备液($0.04\% \text{ HCl}$ 水溶液溶解,浓度 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),准确移取 CHMFL-FLT3-122 储备液 10 mL 于一烧杯中,另加入缓冲液约 85 mL,用稀 HCl 溶液或 NaOH 溶液调节溶液的 pH,得到一系列不同 pH 的缓冲溶液,用 FE-20 型 pH 计测定溶液的 pH 后将其转移至 100 mL 量瓶,并用缓冲液稀释至刻度,摇匀,作待测液,同法配制各空白溶液。于 1 cm 比色皿中扫描其紫外吸收光谱,选择合适的波长测定其吸光度从而计算得到 pK_{a1} 。

2.2 CHMFL-FLT3-122 二级解离常数 pK_{a2} 的测定

CHMFL-FLT3-122 结构中有 2 个碱性含氮基团,嘧啶环上的氨基碱性很弱,叔胺的碱性较强,两者相差较大,因此可将 CHMFL-FLT3-122 看成是 2 个一元弱碱,用电位滴定法对其 pK_{a2} 进行测定, Benet 法的原理如下^[6-8]:假设 B 为一元弱碱,向初始体积为 $V_0(\text{mL})$ 、浓度为 c_0 的 B 弱碱溶液中,用浓度为 c_T 的标准盐酸滴定,得到平衡反应式: $B + H^+ \rightleftharpoons HB^+$, 电荷平衡:

$$[H^+] + [HB^+] = [OH^-] + [Cl^-] \quad (3)$$

令 $Z = [HB^+]$, 代入式(3)中得:

$$Z = [OH^-] + [Cl^-] - [H^+] \quad (4)$$

HB⁺的酸解离常数 K_a 为:

$$K_a = \frac{[H^+][B]}{[HB^+]} \quad (5)$$

根据物料平衡:

$$c_0 = [B] + [HB^+] \quad (6)$$

将式(4)、(6)代入式(5)得:

$$Z = c_0 - ZK_a/[H^+] \quad (7)$$

其中 $Z = [OH^-] + [Cl^-] - [H^+]$, $[Cl^-] = c_T V / (V_0 + V)$, V 为加入滴定液的体积。令 $y = Z$, $x = Z/[H^+]$, 则式(7)为 $y = c_0 - K_a x$ 。以 y 对 x 作图, 斜率即为 $-K_a$, 从而得到 pK_a 。

因此, 根据上述 Benet 法原理, 且 CHMFL-FLT3-122 难溶于水, 但易溶于乙腈的性质, 采用文献[9]的方法, 分别以乙腈-水体积比为 30:70, 40:60, 50:50, 60:40 作为溶剂, 配制浓度为 0.009, 0.013, 0.017 mol·L⁻¹ 的 CHMFL-FLT3-122 溶液 50 mL, 用浓度为 0.05 mol·L⁻¹ 的盐酸滴定液(已标定)滴定, 记录加入滴定液的体积 V 以及相应溶液的 pH, 计算 $y(Z)$ 及 $x(Z/[H^+])$, 以 y 对 x 作图, 进行回归分析, 由此求出不同浓度 CHMFL-FLT3-122 在不同比例的乙腈-水溶液中的 pK_{a1} 。在同一浓度条件下, 以求得的 pK_{a1} 对乙腈-水比例作图, 外推到水中即乙腈为 0 时(方程的截距), 即为该浓度条件下 CHMFL-FLT3-122 在水中的 pK_{a2} 。以求得的 pK_{a2} 对 CHMFL-FLT3-122 的浓度作图, 根据方程的截距得无限稀释溶液中的值即为 CHMFL-FLT3-122 的 pK_{a2} 。

3 结果与讨论

3.1 CHMFL-FLT3-122 一级解离常数 pK_{a1} 测定

3.1.1 解离过程的确定和测定波长的选择 按“2.1”项下方法进行初步测定, 再根据分析, 进一步实验。从一系列不同 pH 值缓冲液中 CHMFL-FLT3-122 的紫外吸收光谱可以看出 CHMFL-FLT3-122 在 $pH \leq 2.93$ 的缓冲液中, 紫外吸收光谱行为一致, 可看作仅以双离子型(CHMFL-FLT3-122 的共轭酸)存在; 在 $pH 2.93 \sim 4.95$ 之间的缓冲液中, 产生不同的紫外吸收曲线, 可看作部分以双离子型、部分以一级解离子型存在; 在 $pH \geq 4.95$ 的缓冲液中, 紫外吸收光谱行为基本一致, 可看作一级解离完全, 即使其存在二级解离, 但由于发生二级解离的叔胺无紫外吸收, 所以紫外吸收光谱基本无差异, 见图 2~4。

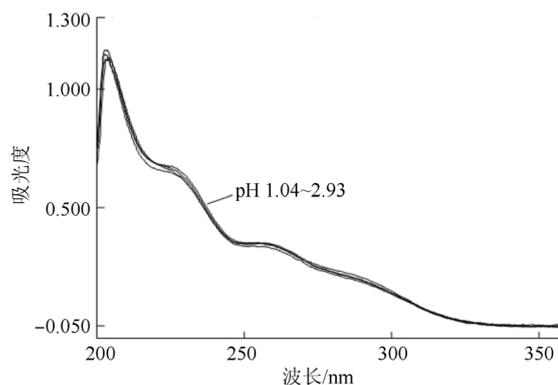


图 2 CHMFL-FLT3-122 在不同 pH 缓冲液中的紫外吸收光谱(pH 1.04~2.93)

Fig. 2 UV spectrum of CHMFL-FLT3-122 in different pH buffer (pH 1.04~2.93)

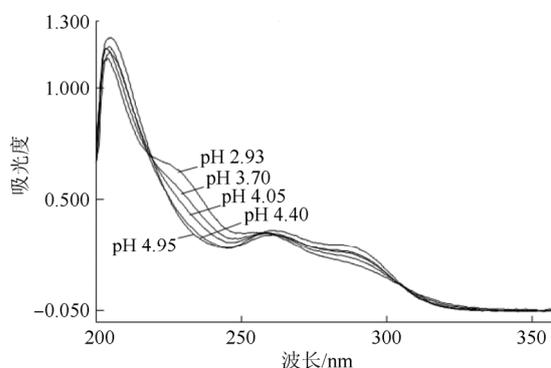


图 3 CHMFL-FLT3-122 在不同 pH 缓冲液中的紫外吸收光谱(pH 2.93~4.95)

Fig. 3 UV spectrum of CHMFL-FLT3-122 in different pH buffer (pH 2.93~4.95)

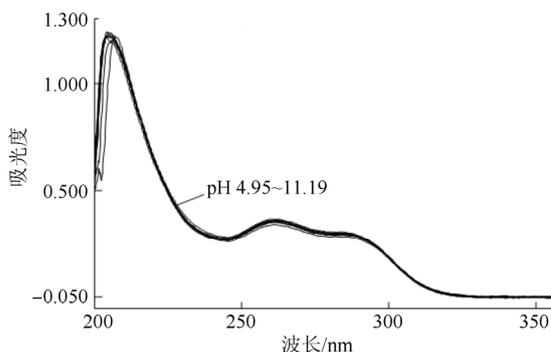


图 4 CHMFL-FLT3-122 在不同 pH 缓冲液中的紫外吸收光谱(pH 4.95~11.19)

Fig. 4 UV spectrum of CHMFL-FLT3-122 in different pH buffer (pH 4.95~11.19)

根据以上实验结果, 选择紫外吸收系数差异大, 吸收曲线较平坦的波长作为测定波长。本研究选择 230 和 290 nm 2 个波长作为测定波长, 在

测定波长处测定不同 pH 缓冲液中 CHMFL-FLT3-122 的吸光度用于解离过程中 pK_{a1} 的研究。

3.1.2 吸光度的测定及 pK_{a1} 的计算 在上述选定波长下, 在 pH 2.52~5.46 之间, 测定了 CHMFL-FLT3-122 的吸光度(A)随 pH 值的变化情况, 结果见表 1。根据表 1 的吸光度值, 按(2)式计算 pK_{a1} 值, 结果见表 2。

表 1 CHMFL-FLT3-122 在不同 pH 缓冲液中的吸光度
Tab. 1 The absorbance of CHMFL-FLT3-122 in different pH buffer solutions

编号	pH 值	A_{230nm}	A_{290nm}
1	2.52	0.622	0.195
2	3.70	0.524	0.225
3	4.05	0.475	0.241
4	4.40	0.414	0.253
5	5.46	0.380	0.277

表 2 CHMFL-FLT3-122 的解离常数 pK_{a1}
Tab. 2 The dissociation constant pK_{a1} of CHMFL-FLT3-122

编号	pH 值	pK_{a1}	
		A_{230nm}	A_{290nm}
1	3.70	3.87	3.94
2	4.05	3.86	3.93
3	4.40	3.61	4.02
平均值		3.87±0.14	

不同 pH 值的样品溶液在不同波长处测得的 pK_a 值应是一致的, 其差异由方法本身及测定误差引起。取平均值作为最后结果可减小误差, 由本法测得 CHMFL-FLT3-122 的 pK_{a1} 值为(3.87±0.14)。

3.2 CHMFL-FLT3-122 二级解离常数 pK_{a2} 测定

3.2.1 CHMFL-FLT3-122 溶液配制 按“2.2”项下方法, CHMFL-FLT3-122 浓度分别为 0.009, 0.013, 0.017 mol·L⁻¹, 各浓度均分别按照乙腈-水配比 30:70, 40:60, 50:50, 60:40 进行实验。

3.2.2 pK_{a1} 测定结果 计算 $y(Z)$ 及 $x(Z/[H^+])$, 以 y 对 x 作图, 进行回归分析, 结果见表 3。由此求出不同浓度 CHMFL-FLT3-122 在不同比例的乙腈-水溶液中的 pK_{a1} , 结果见表 4。

3.2.3 pK_{a2} 测定结果 在同一浓度条件下, 以求得的 pK_{a1} 对乙腈-水比例作图, 外推到乙腈为 0 时(方程的截距), 即为该浓度条件下 CHMFL-FLT3-122 在水中的 pK_{a2} , 结果见表 5。

表 3 不同浓度和不同乙腈-水比例下 CHMFL-FLT3-122 滴定曲线的线性回归方程

Tab. 3 The linear regression equations of the titration curve of different concentrations of CHMFL-FLT3-122 in different proportions of acetonitrile-water

浓度/mol·L ⁻¹	乙腈-水体积比	线性回归方程	r
0.009	30:70	$y=-9.3 \times 10^{-9}x+7.4 \times 10^{-3}$	0.998 9
	40:60	$y=-1.1 \times 10^{-8}x+7.4 \times 10^{-3}$	0.999 1
	50:50	$y=-1.3 \times 10^{-8}x+7.4 \times 10^{-3}$	0.998 9
	60:40	$y=-1.4 \times 10^{-8}x+7.4 \times 10^{-3}$	0.998 1
0.013	30:70	$y=-8.5 \times 10^{-9}x+1.0 \times 10^{-2}$	0.999 1
	40:60	$y=-9.7 \times 10^{-9}x+1.0 \times 10^{-2}$	0.997 2
	50:50	$y=-1.1 \times 10^{-8}x+1.0 \times 10^{-2}$	0.998 9
	60:40	$y=-1.3 \times 10^{-8}x+1.0 \times 10^{-2}$	0.998 1
0.017	30:70	$y=-7.8 \times 10^{-9}x+1.3 \times 10^{-2}$	0.997 9
	40:60	$y=-8.7 \times 10^{-9}x+1.3 \times 10^{-2}$	0.999 2
	50:50	$y=-9.8 \times 10^{-9}x+1.3 \times 10^{-2}$	0.999 0
	60:40	$y=-1.2 \times 10^{-8}x+1.3 \times 10^{-2}$	0.997 2

表 4 不同浓度 CHMFL-FLT3-122 在乙腈-水混合体系中的 pK_{a1}

Tab. 4 pK_{a1} of different concentrations of CHMFL-FLT3-122 in different ratio of acetonitrile-water mixtures

浓度/ mol·L ⁻¹	乙腈-水			
	30:70	40:60	50:50	60:40
0.009	8.03	7.96	7.89	7.84
0.013	8.07	8.01	7.95	7.88
0.017	8.11	8.06	8.01	7.92

表 5 不同浓度 CHMFL-FLT3-122 的 pK_{a1} 与乙腈-水的线性回归方程及 pK_{a2}

Tab. 5 The pK_{a1} /acetonitrile-water linear regression equations of different concentrations of CHMFL-FLT3-122 and pK_{a2}

浓度/mol·L ⁻¹	线性回归方程	pK_{a2}
0.009	$y=-0.638x+8.218$	8.218
0.013	$y=-0.647x+8.268$	8.268
0.017	$y=-0.624x+8.305$	8.305

以求得的 $pK_{a1}(b)$ 对浓度(a)作图, 得方程 $b=10.88a+8.12(r=0.992 6)$, 根据方程的截距得无限稀释浓度的 pK_{a2} 为 8.12, 即 CHMFL-FLT3-122 的 pK_{a2} 为 8.12。

3.3 讨论

本研究曾尝试仅使用 UV 或电位滴定法对 CHMFL-FLT3-122 的解离常数进行测定, 但发现使用 UV 时, 仅其双离子型(CHMFL-FLT3-122 的共轭酸)和一级解离离子型的紫外吸收差异较大, 而一级解离离子型和分子型的紫外吸收基本无差

异, 考虑到是由于叔胺无紫外吸收导致的, 因而不能使用 UV 对其 pK_{a2} 进行测定; 而使用电位滴定法, 由于 CHMFL-FLT3-122 嘧啶环上的氨基碱性太弱, 无明显的滴定突跃, 因而无法对其 pK_{a1} 进行测定。所以最终选择使用 UV 和 Benet 法分别对其 pK_{a1} 和 pK_{a2} 进行测定。

CHMFL-FLT3-122 在纯水中溶解度较差, 为保证其 pK_{a2} 测定的准确性, 应进行预试验, 选择合适的溶剂, 使其既能溶解药物, 又能与水混溶。预实验表明, 乙腈是最佳溶剂, 并在此基础上, 选择合适的药物浓度、溶剂配比以及合适浓度的盐酸滴定液进行滴定。

UV 测定化合物的解离常数是基于在不同 pH 值的条件下, 不同状态的物质摩尔比不同, 从而导致紫外吸收光谱的差异, 因此, 测定波长的选择对结果的准确性极为重要。在选定波长处, 在不同 pH 值的溶液中, 吸收差异必须明显, 变化较大, 否则误差较大^[10]。因此, 本研究选择 230 和 290 nm 2 个吸收差异较大处波长作为测定波长, 此外, 所选波长对应的吸收曲线最好较平坦, 本研究中 230 nm 处吸收曲线不能完全达到这一要求, 可能会对结果测定产生一定误差, 取平均值作为最后结果则可减小误差。解离常数的测定容易受温度等因素的影响, 所以本实验是均在恒温 (25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 的条件下配制样品并测定, 以减少误差^[5]。

4 结论

CHMFL-FLT3-122 作为一种新型潜在治疗 FLT3-ITD 阳性 AML 的候选药物, 其解离常数国内外均无报道, 本研究采用 UV 和 Benet 法分别对其 pK_{a1} 和 pK_{a2} 进行测定, 得到 CHMFL-FLT3-122 的 pK_{a1} 值为 (3.87 ± 0.14) , pK_{a2} 值为 8.12, 方法简单快速, 准确可靠, 可为其制剂的处方设计、质

量标准的研究提供参考。

REFERENCES

- [1] GUO X X, LAN Q Y, RUAN C, et al. Advances in the study of inter action mode, structure activity relationship and clinical trials of FLT3 inhibitors [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2016, 25(17): 1960-1966.
- [2] LI X, WANG A L, YU K L, et al. Discovery of (R)-1-(3-(4-amino-3-(4-phenoxyphenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)-2-(dimethylamino)ethanone (CHMFL-FLT3-122) as a potent and orally available FLT3 kinase inhibitor for FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia [J]. J Med Chem, 2015(58): 9625-9638.
- [3] HE J C, LI S, LUO Y. Determination of the dissociation constant of shikimic acid by UV spectrophotometry [J]. J Mianyang Norm Univ(绵阳师范学院学报), 2006, 25(5): 40-42.
- [4] 李慧, 张起, 赵燕芳, 等. 抗痛风药 SE-10 平衡溶解度、表观油水分配系数及解离常数的测定[J]. 中国药剂学杂志(网络版), 2015(1): 27-34.
- [5] SONG Y L, PU J X, ZHANG W, et al. Determination of dissociation constants of norathyriol by UV spectrophotometry [J]. J Yunnan Univ Tradit Chin Med (云南中医学院学报), 2014, 37(5): 20-23.
- [6] WANG C X, LIU Y L. Nonlogarithmic titration method for the determination of dissociation constant of loratadine [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2003, 38(11): 44-45.
- [7] LI Y G, CHEN H F, TU M Z, et al. Nonlogarithmic titration method for the determination of dissociation constant of auraptene [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2011, 22(6): 1304-1305.
- [8] YAN J W, YANG H, WANG J. Determination the dissociation constant and oil/water partition coefficient of dipfluzine [J]. Chin Pharm(中国药房), 2013, 24(41): 3868-3870.
- [9] BENET L Z, GOYAN J E. Nonlogarithmic titration curves for the determination of dissociation constants and purity[J]. J Pharm Sci, 1965(8): 1179-1182.
- [10] LIU X J, YANG D J, LUO J Y, et al Determination of dissociation constants of puerarin and its derivative by UV-spectrophotometry [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2006, 17(11): 2206-2207.

收稿日期: 2017-02-09

(本文责编: 蔡珊珊)