

# 在胆酸盐介质中用氨羧配位剂溶解胆红素钙的动力学研究\*

计季\*\* 许善锦 王夔

(北京医科大学药学院)

以胆红素及其钙盐为主要成分的色素型胆结石病在国内为常见病,多年来曾研究用钙配位剂溶石的可能性,但效果不明显,主要由于对配位剂溶石机理了解不够。为此本文在模拟胆汁背景条件下,用氨羧配位剂溶解模拟结石的胆红素钙压片进行了动力学研究,其结果有利于阐明胆色素结合配位溶解的机理和决定溶石效果的因素。

**关键词:** 胆红素钙 氨羧配位剂 动力学

## 实验部分

### 一、试剂与仪器

胆酸钠(简称CA, Sigma), 含量高于98%,胆红素(简称BL, Sigma及Fluka)鉴定纯度符合标准。乙二胺四乙酸二钠(EDTA·2Na)及氨三乙酸(NTA)为北京试剂(AR)。二乙三胺五乙酸(DTPA)和乙二醇二乙醚二胺四乙酸(EGTA)为CP级(北京),均重结晶三次。其余试剂均为AR或GR级(北京)。

721分光光度计, WFX-1型原子吸收分光光度计。

### 二、方法

1. 胆红素钙的制备:综合Sator法<sup>[1]</sup>和Maki法<sup>[2]</sup>稍做改进,方法如下:

50毫克胆红素置于50毫升 $5 \times 10^{-3}$ M氢氧化钠溶液中摇匀,放置在冰箱中(4℃)15分钟使溶解。搅拌下加入新过滤的饱和石灰水60~80毫升,在冰箱中静置1~2小时后,抽滤出胆红素钙,依次用去离子水、三氯甲烷、甲醇各洗数次,真空干燥避光保存。

本文于1986年11月8日收到。

\* 中国科学院科学基金资助的课题

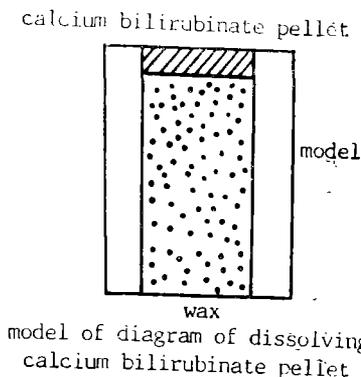
\*\* 本工作为计季硕士学位论文的一部分

在特制有机玻璃冲模中,将0.1克胆红素钙(过180目筛)用油压机以1200磅/厘米<sup>2</sup>压力压成直径为11毫米的薄片。在冲模空隙中灌入石蜡,密封使压片只有一面接触溶液。(见图)

配制离子强度为0.15(NaCl) pH为8.5(0.01M Tris-HCl缓冲)的含 $1.0 \times 10^{-4}$ M配位剂溶液和 $6.0 \times 10^{-3}$ M胆酸钠溶液作为溶石液。用同法配制无胆酸钠存在下各配位剂溶液及有胆酸钠无配位剂存在下的溶液。

2. 溶解动力学测定方法:用Higuchi<sup>[3]</sup>方法,在恒温、恒速搅拌、恒pH条件下进行溶解过程研究。

将带胆红素钙片的冲模放入已恒温在 $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 的492毫升溶石液(原500毫升中取两份4.00ml溶液测胆红素及钙做为空白)中,在 $37^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$ 恒温、避光、通氮条件下,以100rpm恒速搅拌。间隔适当时间取4.00ml溶液,测胆红素及钙。直至含钙量和胆红素量不随时间改变。此时的钙量和胆红素量分别为它们各自的最大溶出量。(空冲模预试验结果说明冲模无干扰测定的物质溶出)。用原子吸收法测定每份溶液中的总钙量,用分光光度法测胆红素(无CA和有CA存在下的测量波长分别为438nm及427nm)。



## 数据处理及结果

用固相溶解与形成的速率表达式表示胆红素钙溶出速率时为

$$\frac{dM}{dt} = sk(M_\infty - M_t)^{1/2} \quad (1)$$

其中,  $\frac{dM}{dt}$  表示某时刻的溶解速率(溶液中钙或胆红素摩尔数随时间的增长率),  $M_t$  为某时刻溶液中钙或胆红素的总摩尔数,  $S$  为胆红素钙片的截面积(0.95厘米<sup>2</sup>),  $M_\infty$  表示时间为无限大时溶液中钙或胆红素的总摩尔数。

在整个溶解过程中取样  $N$  次后,最终体积减少到  $V_f$ , 即

$$V_f = V_0 - 4N$$

溶出总摩尔数  $M_\infty$  应为:

$$M_\infty = V_f C_\infty + 4 \sum_{i=1}^N C_i \quad (2)$$

其中,  $C_\infty$  表示溶解最终达平衡时的溶液的浓度,  $C_i$  为第  $i$  次取样时溶汇的浓度。

可用类似方法表示在时间  $t$  经  $J$  次取样后溶出的总摩尔数  $M_t$ :

$$M_t = (V_0 - 4J) C_t + 4 \sum_{i=1}^J C_i \quad (3)$$

其中,  $J$  为到某时刻已取样次数 (每次取 4.00 ml)  $C_t$  为  $t$  时刻时溶液中钙或胆红素的浓度。

由于溶石液中本身含少量钙 ( $M_0$ ) 故要由测得溶出钙最大量  $M_\infty$  减去  $M_0$  得实际最大溶出量 ( $M_\infty - M_0$ ), 胆红素计算最大溶出量时 ‘因  $M_0 = 0$  故最大溶出量就等于  $M_\infty$ 。

由实验结果计算按式 (2)、(3) 测得的最大溶出量及随时间  $M_t$  的变化 (见图 1、2)。由图可见无论是按钙还是按胆红素的溶出量, 其最大溶出量相对大小都是 EGTA > DTPA > EDTA > NTA。不过前三者差别不大, 但是胆红素溶出速度及最大溶出量均比钙的溶出速度及最大溶出量少。

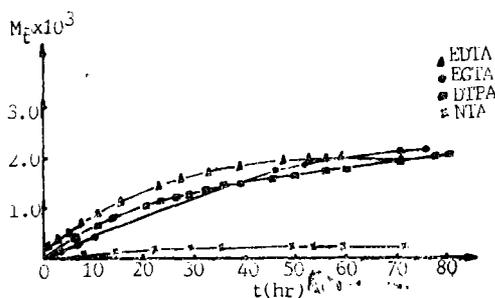


图 1 四种  $1.0 \times 10^{-4}$  M 氨羧配位剂在  $6.0 \times 10^{-3}$  M CA 存在下溶解胆红素钙时溶出胆红素摩尔数随时间变化曲线比较

Fig. 1 Plot of bilirubin mole amount dissolved with four kinds of  $1.0 \times 10^{-4}$  M polyaminocarboxylates (EGTA, DTPA, EDTA, NTA) in the background of  $6.0 \times 10^{-3}$  M sodium cholate against time

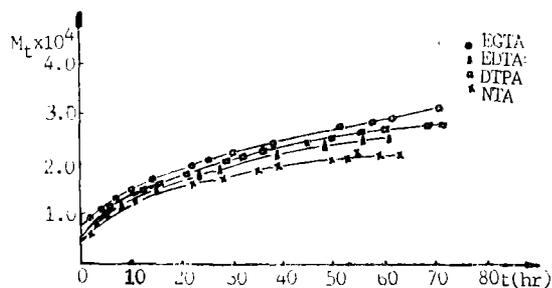


图 2 四种  $1.0 \times 10^{-4}$  M 氨羧配位剂在  $6.0 \times 10^{-3}$  M CA 存在下溶解胆红素钙时溶出钙摩尔数随时间变化曲线比较

Fig. 2 Plot of calcium mole amount dissolved with four kinds of  $1.0 \times 10^{-4}$  M polyaminocarboxylates (EGTA, DTPA, EDTA, NTA) in the background of  $6.0 \times 10^{-3}$  M sodium cholate against time

反应级数的确立:

用  $(M_{\infty} - M_t)$  对  $t$  作图得到各种配位剂溶解曲线 (见图 3、4), 将数据点用计算机程序拟合得到  $M = f(t)$  的曲线方程如下:

$$(M_{\infty} - M_t) = b_1 + b_2 t + b_3 t^2 + b_4 t^3 \quad (4)$$

将(4)微分得到某时刻瞬时速率方程:

$$-\frac{d(M_{\infty} - M_t)}{dt} = b_2 + 2b_3 t + 3b_4 t^2 \quad (5)$$

因  $M_{\infty}$  为常数, 故上式可写为

$$\frac{dM}{dt} = b_2 + 2b_3 t + 3b_4 t^2 \quad (6)$$

为了求反应级数, 将(1)两边取对数得

$$\lg\left(\frac{dM}{dt}\right) = (\lg s + \lg k) + n \lg(M_{\infty} - M_t) \quad (7)$$

由拟合后的方程计算每时刻的  $\frac{dM}{dt}$  及  $(M_{\infty} - M_t)$  值, 将  $\lg\left(\frac{dM}{dt}\right)$  对  $\lg(M_{\infty} - M_t)$  作图应得一直线, 斜率  $n$  为反应级数, 截距为  $(\lg s + \lg k)$ , 并可由此求出  $k$ 。

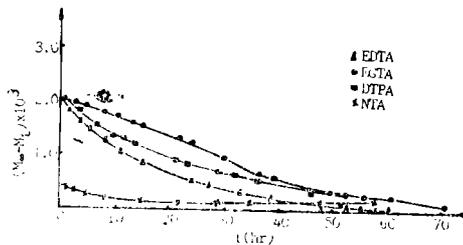


图3 四种  $1.0 \times 10^{-4}$  M 氨羧配位剂在  $6.0 \times 10^{-3}$  M CA 存在下溶解胆红素钙时, 溶出胆红素的  $(M_{\infty} - M_t) \sim t$  曲线

Fig. 3 Plot of bilirubin  $(M_{\infty} - M_t)$  mole amount dissolved with four kinds of  $1.0 \times 10^{-4}$  M polyaminocarboxylates (EGTA, DTPA, EDTA, NTA) in the background of  $6.0 \times 10^{-3}$  M sodium cholate against time

图3中四条曲线的方程为:

$$\text{EGTA: } (M_{\infty} - M_t) = 2.06 \times 10^{-3} - 5.06 \times 10^{-5} t + 1.68 \times 10^{-6} t^2 - 4.07 \times 10^{-8} t^3$$

$$\text{DTPA: } (M_{\infty} - M_t) = 2.02 \times 10^{-3} - 9.43 \times 10^{-5} t + 2.67 \times 10^{-6} t^2 - 3.67 \times 10^{-8} t^3$$

$$\text{EDTA: } (M_{\infty} - M_t) = 1.87 \times 10^{-3} - 1.08 \times 10^{-4} t + 3.64 \times 10^{-6} t^2 - 6.13 \times 10^{-8} t^3$$

$$\text{NTA: } (M_{\infty} - M_t) = 2.99 \times 10^{-3} - 4.32 \times 10^{-5} t + 5.63 \times 10^{-6} t^2 - 3.96 \times 10^{-7} t^3$$

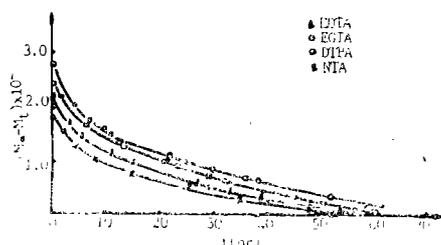


图4 四种 $1.0 \times 10^{-4}$  M 氨羧配位剂在 $6.0 \times 10^{-3}$  M CA存在下溶解胆红素钙时溶出总钙量 $(M_{\infty} - M_t) \sim t$  曲线

Fig. 4 Plot of calcium  $(M_{\infty} - M_t)$  mole amount dissolved with four kinds of  $1.0 \times 10^{-4}$  M polyaminocarboxylates (EGTA, DTPA, EDTA, NTA) in the background of  $6.0 \times 10^{-3}$  M sodium cholate against time

图4中四条曲线方程为:

$$\text{EGTA: } (M_{\infty} - M_t) = 2.59 \times 10^{-2} - 1.55 \times 10^{-3}t + 6.33 \times 10^{-5}t^2 - 1.04 \times 10^{-6}t^3$$

$$\text{DTPA: } (M_{\infty} - M_t) = 2.32 \times 10^{-2} - 1.39 \times 10^{-3}t + 5.81 \times 10^{-5}t^2 - 1.05 \times 10^{-6}t^3$$

$$\text{EDTA: } (M_{\infty} - M_t) = 2.07 \times 10^{-2} - 1.81 \times 10^{-3}t + 1.02 \times 10^{-4}t^2 - 2.02 \times 10^{-6}t^3$$

$$\text{NTA: } (M_{\infty} - M_t) = 1.81 \times 10^{-2} - 1.62 \times 10^{-3}t + 8.01 \times 10^{-5}t^2 - 1.38 \times 10^{-6}t^3$$

测得初始反应表观级数见表1。NTA的溶解能力很弱,所以测定结果精度较差。表1中的实测有效反应级数均非整数,溶出钙的n值均趋于2,而以胆红素溶出反应计,则n值不等。 $k$ 值仍按实测曲线拟合后求得。由于溶出过程进行到一定程度,压片表面发生了形变,故只取前30小时以内的数据进行计算。

表1 四种氨羧配位剂以胆酸钠为介质溶解胆红素钙时的反应级数及速率常数

Table 1 Order of reaction and the rate constant during calcium bilirubinate dissolved with four kinds of polyaminocarboxylates in the background of  $6.0 \times 10^{-3}$  M sodium cholate

polyamino-carboxylate name	time (hour)	bilirubin dissolved		calcium dissolved	
		n (order)	k	n (order)	k
EGTA	0-7	3 (2.8)*	$2.11 \times 10^{-3}$ $\text{mole}^{-2} \text{hr}^{-1}$	2 (1.7)	0.896 $\text{mole}^{-1} \text{hr}^{-1}$
DTPA	0-18	2 (1.6)	2.26 $\text{mole}^{-2} \text{hr}^{-1}$	2 (2.1)	4.18 $\text{mole}^{-1} \text{hr}^{-1}$
EDTA	0-7	1 (1.2)	0.251 $\text{hr}^{-1}$	2 (2.0)	4.25 $\text{mole}^{-1} \text{hr}^{-1}$
NTA	0-5	1 (1.4)	3.89 $\text{hr}^{-1}$	2 (1.8)	1.88 $\text{mole}^{-1} \text{hr}^{-1}$

\* numbers in brackets express real reaction order we determined

胆红素与钙溶解过程的不同, 不仅表现在反应级数上, 也表现在胆红素与钙并不是按固相的化学计量比(1:1)溶出上。由图5溶出钙与胆红素摩尔比随着时间的变化曲线可以看出开始时钙的溶出量远大于胆红素。随反应进行则趋于基本恒定, 但钙与胆红素溶出的摩尔比仍大于10。当然由于胆红素不十分稳定测定结果误差大些。

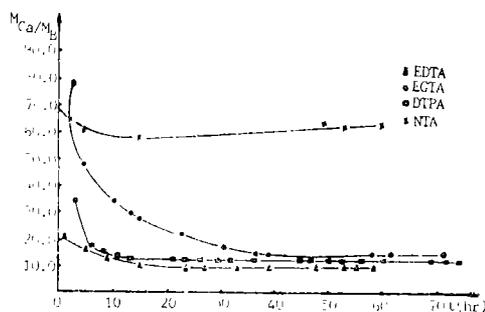


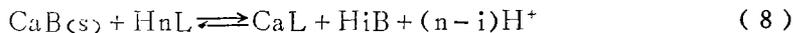
图5 四种 $1.0 \times 10^{-4}$  M氨羧配位剂在 $6.0 \times 10^{-3}$  M CA存在下溶解胆红素钙时, 溶出钙的总摩尔数与胆红素摩尔数之比随时间变化曲线

Fig. 5 Ratio of all calcium mole amount to all bilirubin mole amount dissolved with four kinds of polyaminocarboxylates (EGTA, DTPA, EDTA, NTA) in the background of  $6.0 \times 10^{-3}$  M sodium cholate against time

## 讨 论

### 一、用钙配位剂溶解胆红素钙压片的反应过程

按一般难溶盐的溶解规律, 组成为1:1的胆红素钙溶于配位剂( $H_nL$ 为该pH下的存在形式)溶液的化学反应为:



钙与胆红素应按1:1摩尔比同步溶解, 即在任意时间内两者溶出曲线应基本一致。但实验结果表明钙与胆红素的溶出并不同步(见图5)。开始时表层大量钙溶出, 而胆红素溶出甚少, 随反应进行,  $M_{Ca}/M_B$ 先迅速下降, 但最后 $M_{Ca}:M_B$ 仍大于1:1, 说明在表层钙的溶出为胆红素的溶解创造了条件。可以用下列两步反应表示溶解的过程:



即胆红素钙中的钙溶出后, 留下了胆红素的固相, 而后者以较慢速度溶解。胆红素与钙之所以不同步溶出可能由于胆红素钙固相不是一个典型的离子晶体, 它的胆红素离子并不是分立的, 而是聚合的。钙离子通过羧基结合在这一高聚物网络之中。因此, 配位剂可以溶出钙离子, 而留下胆红素聚合物。聚合物要在胆酸钠的增溶下慢慢地溶解, 但它的溶解速度始终低于钙的溶解速度。吴瑾光<sup>[4]</sup>、周孝思<sup>[5]</sup>等报道了用EDTA溶解色素结石时残留一种难溶物质。对于色素结石中难溶残渣的本质 Suzuki 曾认为是胆红素

的高聚物<sup>[6]</sup>，其配合物可能是胆红素钙的聚合物<sup>[7]</sup>。Rege<sup>[8]</sup>用红外光谱证明未结合的胆红素在 $998\text{cm}^{-1}$ 和 $991\text{cm}^{-1}$ 处有较强的乙烯基峰，而在胆红素钙和胆色素结石中这两个峰明显减弱，认为大量的乙烯基在生成聚合物时被消耗掉。我们做的溶解前和溶解后的胆红素钙压片的红外光谱也见此表征。可以认为配合剂只能将表层一部分钙夺去，而剩余物中包含胆红素及胆红素钙的聚合物。迄今关于配位剂溶解残留物的本质问题，说法不一，多数人认为是糖蛋白。以上结果表明即使没有糖蛋白存在，也有这种残留物存在，它与胆红素钙的聚合有关。

## 二、钙最大溶出量与条件稳定常数的关系

用 $S_{\infty}$ 表示溶液总钙浓度时，

$$S_{\infty} = [\text{CaL}] + [\text{CaCA}] + [\text{Ca}] \quad (10)$$

因胆汁酸配位的钙( $[\text{CaCA}]$ )和游离钙( $[\text{Ca}]$ )与 $\text{CaL}$ 相比可以忽略，可以推测不同配位剂溶石能力的大小顺序与配合物在此条件下的稳定常数顺序一致。

根据在胆酸盐背景中四种氨羧配位剂的电离常数和钙配合物稳定常数<sup>[9]</sup>，计算pH 8.5的条件稳定常数 $\beta'_{\text{CaL}}(\text{cond})$ 与钙的最大溶出量见表2。

表2  $7.0 \times 10^{-3}\text{MCA}$ 为背景的氨羧配位剂与钙配合物的条件稳定常数及钙的最大溶出量

Table 2 Conditional stability constants of calcium polyaminocarboxylates and protonation constants of polyaminocarboxylates in the background of  $7.0 \times 10^{-3}\text{M}$  sodium cholate and the solubility of calcium dissolved with four kinds of polyaminocarboxylates in the background of  $6.0 \times 10^{-3}\text{M}$  sodium cholate

polyamino-carboxylate name	EGTA	DTPA	EDTA	NTA
$\lg \beta'_{\text{CaL}}$	7.84	8.02	7.11	4.63
$\lg \alpha'_{\text{H}(\text{I})}$	0.86	1.11	0.92	0.77
$\lg \beta_{\text{CaL}}(\text{cond})$	6.98	6.91	6.22	3.86
solubility of calcium(M)	$6.47 \times 10^{-2}$	$5.70 \times 10^{-2}$	$5.02 \times 10^{-2}$	$4.32 \times 10^{-3}$

可见在pH8.5胆酸盐背景中 $\lg \beta'_{\text{CaL}}(\text{cond})$ 的大小顺序为 $\text{EGTA} > \text{CTPA} > \text{EDTA} > \text{NTA}$ ，它们的最大溶出量基本上符合上述顺序。NTA的 $\beta'$ 比前三者低得多，但最大溶出量相差不多，这可以归结于残留的胆红素固相转而阻止钙的溶出所致。从图1、2可以看出钙的溶出是分段的，前一段溶液的不饱和度很高时溶出迅速，可能为扩散控制，配位剂主要与溶液中钙结合，后一段溶出开始在固相表面甚至深入内部而受到阻碍。这与Nancollao<sup>[10]</sup>讨论的草酸钙的化学溶解过程相似。胆红素的溶解过程始终在表面进行，没有发生阻化现象。因此，按胆红素汁的最大溶出浓度应由残留固相与溶液间的平衡决定。虽然如此，配位剂溶出钙的能力大小也有影响，因钙的溶出是胆红素溶出的前提。钙溶出量决定于残留物接触溶液的面积，所以溶出钙愈多，胆红素溶出的机会愈多。

### 三、胆汁酸盐与配位剂的协同作用

我们用单独胆酸钠或配位剂的溶液做溶石对照实验,结果如图6所示。(四种氨羧配位剂溶解胆红素钙压片所得结果类似)。结果表明在有胆酸钠与配位剂合用溶解胆红素钙压片的效果远大于单独使用溶解效果之和。特别是胆酸盐单独溶解胆红素钙压片时钙与胆红素几乎不溶出。这说明胆酸盐与配位剂对胆红素钙的溶解起着重要的协同作用。

胆汁酸盐既可作为表面活性剂起作用也可作为配体与钙离子相互作用。

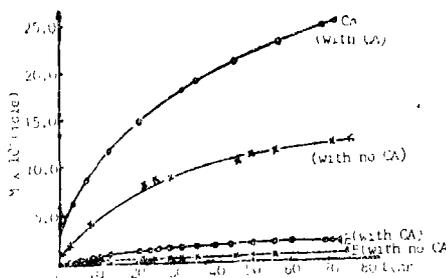


图6  $1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$  DTPA在有和无 $6.0 \times 10^{-3} \text{ M}$  CA存在下溶解胆红素钙时钙和胆红素溶出曲线比较

Fig 6 Plot of bilirubin and calcium mole amount dissolved with  $1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$  DTPA in the presence and absence of  $6.0 \times 10^{-3} \text{ M}$  CA respectively

胆汁酸盐对胆红素的增溶作用早已为人们熟知。Makino<sup>[11]</sup>最近报道了胆囊胆汁中结合胆汁酸对碳酸钙的增溶作用。Moore<sup>[13]</sup>认为胆汁酸胶束与钙离子的结合在抑制结石形成中也起一定作用。在配位剂将胆红素钙中的钙以生成配合物形式夺走后,剩下胆红素网络结构的溶解主要靠胆酸盐对胆红素的增溶作用,这就是前面提出的两步溶解过程中的第二步。胆红素网络部分地溶解使得配位剂有更多的机会接触残留物表面,使钙溶出,而钙的溶出又使胆红素网络表面积增大,促使胆酸盐增溶它,这样反复进行这一过程,可以认为是胆汁酸和配位剂对胆红素钙溶解起的协同作用。

由我们的实验结果可以得出两点,第一,氨羧配位剂与胆汁酸盐合用对溶石有较好的效果,前者溶出钙而后者可增溶分散胆红素及胆红素钙。第二,难溶物为聚合的胆红素,糖蛋白可以是聚集的因素,但不是结石难溶的唯一因素。

### 参 考 文 献

- [1] Sutor, D.J. et al., *Clinical Science and Molecular Medicine*, 53, 101 (1977).
- [2] Maki, T. et al., *Tohoku J. Exp. Med.*, 82, 117(1964).
- [3] Higuchi, W.I. et al., *J. Pharm. Sci.*, 66(8), 1094(1977)
- [4] 吴瑾光, 周孝思, 北京大学学报(自然科学版)(1), 34(1980).
- [5] 周孝思, 张克立等, 第九届全国外科学学术会议论文摘要P. 156(1978).
- [6] Suzuki, N., *Tohku J. Exp. Med.*, 85, 396(1965).
- [7] Suzuki, N., *Tohku J. Exp. Med.*, 90, 195(1966).
- [8] Rege, R.V. et al., *Biochem. J.*, 224, 871(1984).
- [9] 计季, 许普锦, 王夔, 高等学校化学学报7(10), 885(1986).

- [10] Nancollas, G.H. et al., *Urolithiasis and Related Clinical Researches*, Plenum, New York, P.747(1985).
- [11] Makino, J. et al., *Journal Of Japanese Gastroenterology* 86(6), 1351 (1983).
- [12] Moore, E.W., *Gastroenterology*, 83 1979(1982)

## STUDY ON DISSOLUTION OF CALCIUM BILIRUBINATE PELLET WITH POLY- AMINOCARBOXYLATES IN BACK- GROUND OF SODIUM CHOLATE

Ji Ji Xu Shanjin Wang Kui

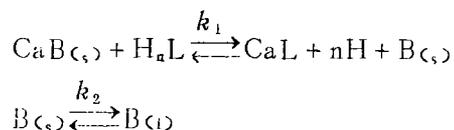
(*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Beijing  
Medical University, Beijing*)

In order to clarify the development of a chemical model simulating the chelating dissolution treatment of this kind of stone, the processes of the dissolution of calcium bilirubinate pellet with complexones (EHTA, EDTA, NTA, DTPA) in the presence of sodium cholate were studied by means of static method, which is similar with that used by Higuchi for the studies of dissolution of cholesterol. The rate of dissolution as well as the limit of dissolution were determined through the monitoring of calcium (with atomic absorption spectroscopy) and bilirubin (with spectrophotometric method). The calcium bilirubinate is of a composition of Ca: Bilirubin = 1:1. The results show that Ca and bilirubin are dissolved in two different routes, thus the amount of Ca dissolved is much higher than that of bilirubin, while the dissolution rate of Ca is much higher than that of bilirubin as well. The solubilities of calcium bilirubinate pellet in four complexones decrease as such:

EGTA > DTPA > EDTA > NTA

which is roughly parallel with the conditional stability constants sequence of their calcium complexes.

A two-step route is proposed to interpret the dissolution:



**Keywords:** calcium bilirubinate polyaminocarboxylate kinetics