

· 制剂与质量 ·

14-去氧穿心莲内酯-环糊精包合机制的研究

韩 光^{1,2}, 李景华³, 郭国超^{1,2}, 王钰涵^{1,2}*

(1. 河南大学药物研究所, 河南 开封 475004; 2. 河南大学药学院, 河南 开封 475004;

3. 河南省天然药物与免疫工程重点实验室, 河南 开封 475004)

摘要:目的 从包含比例、主客体分子间相互作用、包含部位和包含稳定性方面研究阐明 14-去氧穿心莲内酯和-环糊精形成包合物的机制。方法 采用差示热分析法确证包合物的形成, 紫外法测定包含常数并计算热力学常数, IR、¹H-NMR 确证包含部位。结果 包含常数 (K_a) 值为 1 292. 631 L/mol; 包含过程 $G = -16. 854 8$; $H = -25. 532$; $S = -0. 029 12$ 。由 IR 和 ¹H-NMR 可以看出包合物中 14-去氧穿心莲内酯五元内酯环及十氢萘环部分发生了变化。结论 形成包合物的主客体比例为 1 : 1, 范德华力在包含过程中起主要作用, 包含部位为十氢萘环及五元内酯环, 形成的包合物常温下比较稳定。

关键词: 14-去氧穿心莲内酯; -环糊精; 包合物; 差示热分析法

中图分类号: R286. 2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)02-0212-05

Studies on inclusion mechanism of 14-deoxyandrographolide- β -cyclodextrinHAN Guang^{1,2}, LI Jing-hua³, GUO Guo-chao^{1,2}, WANG Yu-han^{1,2}

(1. Pharmaceutical Institute of Henan University, Kaifeng 475004, China; 2. Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng 475004, China; 3. Key Laboratory of Natural Medicine and Immunol Engineering, Kaifeng 475004, China)

Abstract : Objective To study the inclusion mechanism of 14-deoxyandrographolide and β -cyclodextrin in inclusion ratio, molecular interaction between host and guest, inclusion part and stability of inclusion compound. **Methods** The formation of inclusion compound was confirmed by differential thermal analysis (DTA); The equilibrium constants of inclusion compound were determined and the thermodynamic constants were calculated by UV; Inclusion parts were confirmed by IR and ¹H-NMR. **Results** $K_a = 1 292. 631 \text{ L/mol}$; $G = -16. 854 8$; $H = -25. 532$; $S = -0. 029 12$. It was clearly that all five lactone ring and decalin ring of 14-deoxyandrographolide in inclusion compound changed in IR and ¹H-NMR. **Conclusion** Inclusion host-guest ratio is 1 : 1, Van der Waals forces play a major role in the process. Inclusion site is decalin ring and five lactone ring. The inclusion compound is more stable under normal temperature.

Key words : 14-deoxyandrographolide; β -cyclodextrin; inclusion compound; differential thermal analysis (DTA)

14-去氧穿心莲内酯是穿心莲的活性成分之一, 具有较好的抗炎活性^[1], 但其脂溶性较强, 生物利用度低, 使其进一步的利用受到了限制。-环糊精包合技术应用于药物制剂不仅能保留药物原有的化学性质, 更可以显著改善药物的物理性质, 促进药物稳定, 提高难溶性药物的溶解度和生物利用度^[2]。本实验将 14-去氧穿心莲内酯制成-环糊精包合物, 通过 K_a 值的测定、热力学常数的计算以及红外光谱、核磁共振波谱分析, 从主客体分子间相互作用、包含

比、包含部位以及包合物的稳定性阐述包含机制。

1 仪器与材料

Exstar 6000 热分析系统 (Seiko Instruments Inc); Bruker Advance 400 核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); UV1600 紫外可见分光光度计 (北京瑞利分析仪器公司); Avatar 360 傅里叶变换红外光谱仪 (美国 Nicolet 公司); WP750-1 型微波炉 (南京三乐电气总公司), AG135 电子天平 (Mettler Toledo)。

14-去氧穿心莲内酯由河南大学药物研究所提

* 收稿日期: 2009-06-18

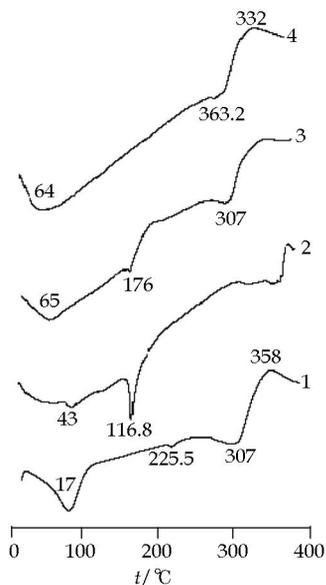
作者简介: 韩 光 (1966—), 女 (蒙古族), 北京人, 博士, 教授, 硕士生导师, 河南省教育厅学术技术带头人, 主持或参与各类基金项目 9 项, 发表论文 20 余篇, 发明专利 3 项。主要研究方向为天然活性成分的研究及新药开发。

Tel: (0378) 2868833-3848 E-mail: hang@henu.edu.cn

供, HPLC 归一化法测定其质量分数大于 99.0%; -环糊精由孟州市华兴生物化工有限责任公司提供, 质量分数为 99.3%; 乙醇(色谱纯, 天津科密欧化学试剂有限公司); 水为二次蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 包合物等的制备: 参考文献报道方法^[3] 制备得到。
 2.2 差示热分析法对物象的分析: 分别取 14-去氧穿心莲内酯、-环糊精、物理混合物和包合物约 5 mg, 置氧化铝坩埚中, 气氛: 静态空气, 参比物: 空氧化铝坩埚, 加热范围: 室温 ~ 500 °C, 升温速率: 10 °C/min, 采样间隔 1 次/s。将坩埚放入热分析系统中测定其 DTA 曲线, 结果见图 1。可见 -环糊精的 DTA 曲线共出现 4 个峰, 在加热过程中首先失去结晶水, 出现 87.7 °C 峰, 然后发生分子重排出现 225.5 °C 峰, 熔融峰 307 °C, 继之 358.8 °C 发生热分解; 14-去氧穿心莲内酯的 DTA 曲线主要出现 1 个吸热峰, 即熔融峰 176.8 °C, 分解峰不明显且不规则; 物理混合物的 DTA 曲线共出现 3 个峰: 65、176、307 °C 峰, 基本上再现了 -环糊精和 14-去氧穿心莲内酯的各特征峰, 表明 -环糊精与 14-去氧穿心莲内酯在混合物中未发生包合作用; 包合物的 DTA 曲线共出现 2 个峰, 其中熔融的吸热峰由 176、307 °C 移至 303.2 °C, 分解吸热峰由 358 °C 移至 332 °C, 提示包合物的形成导致了新物象的生成。



1- -环糊精 2-14-去氧穿心莲内酯 3-物理混合物 4-包合物
 1- cyclodextrin 2-14-deoxyandrographolide
 3-physic mixture 4-inclusion compound

图 1 差示热分析法图

Fig 1 DTA Diagram

2.3 包含常数 (Ka) 值的测定

2.3.1 测定波长的选择: 用 pH 6.86 的缓冲液配制成 4.21×10^{-5} mol/L 14-去氧穿心莲内酯溶液, 进行全波扫描, 选择 200 nm 作为测定波长。

2.3.2 14-去氧穿心莲内酯饱和溶液的制备: 用 pH 6.86 缓冲液配制 14-去氧穿心莲内酯的过饱和溶液, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 弃去初滤液, 续滤液即为 14-去氧穿心莲内酯饱和溶液。

2.3.3 -环糊精溶液的制备: 取 131.2 mg -环糊精置于 10 mL 量瓶中, 加入适量的 pH 6.86 缓冲液, 超声溶解, 缓冲液定容后, 得 11.6 mmol/L -环糊精溶液。

2.3.4 测定: 取一定量 14-去氧穿心莲内酯饱和溶液于比色皿中, 于所选波长范围内紫外扫描得 200 nm 波长下的紫外吸收值, 依次向体系中加入不同量 11.6 mmol/L -环糊精溶液后进行紫外扫描, 得到不同 -环糊精浓度体系的紫外吸收。由公式 (1) 的斜率和截距及 (2) 的斜率可计算得 Ka 值^[4]。

$$1/A = (1/Ka[G]_0) (1/[CD]_0) + 1/[G]_0 \quad (1)$$

$$A = - (1/Ka) (A/[CD]_0) + [G]_0 \quad (2)$$

14-去氧穿心莲内酯分子在 200 nm 附近有一最大吸收, 当体系中存在高浓度的 -环糊精时, 14-去氧穿心莲内酯紫外吸收随着 -环糊精浓度的增加而明显增强, 而且二者成明显的正比关系。提示 -环糊精与 14-去氧穿心莲内酯发生了包合。

由公式 (1) 得曲线方程: $Y = 0.00631 X + 8.15655$ ($R^2 = 0.99743$), 求得 $Ka = 1.292631$ L/mol。由公式 (2) 得曲线方程: $Y = -0.00076 X + 0.12189$ ($R^2 = 0.98839$), 求得 $Ka = 1.315789$ L/mol。利用紫外法的 2 个公式都获得了良好的线性关系, 但求得的 Ka 值有一些差距, 原因为公式 (1) 的推导中简化了许多的影响因素如 -环糊精的吸收等, 易获得较好线性关系, 公式 (2) 考虑到 $A = A_{CD} \cdot G + A_{CD} + A_G$ 等的情况, 较方程 (1) 更接近实际也更严格, 并且对实验操作要求更高, 较难获得良好的线性关系, 所以求得的 Ka 值较准确。

Ka 是衡量包含水平的一个重要参数。当 Ka 值为 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^5$ L/mol 时包含效果最好, 太小不宜包含, 太大则脱包含困难。

包合物的研究中包含比例的确定是十分重要的, 主客体包含比通常为 1:1 或 1:2。包含比例确定一般采用 Benesi-Hildebrand 法和相溶解度法, 方程 (1) 即是 Benesi-Hildebrand 方程, 文献报道^[4] 以 $1/A$ 对 $1/[-环糊精]_0$ 作图, 如为一条直线, 则表明客体分子与 -环糊精形成了 1:1 包合物, 本实

验结果与此相符,证实 14-去氧穿心莲内酯与 α -环糊精形成了 1:1 的包合物。

2.4 热力学常数的测定:选择 15、20、25、30、35 作为测定温度,按照文献报道方法^[3]分别测定其稳定常数,将得到的不同温度下的稳定常数根据

$\ln K_a = -H/RT + S/R$ 公式,以 $\ln K_a$ 对 $1/T$ 作图,得 $\ln K_a = 3.079.859.69 / T - 3.512.48$ ($R^2 = 0.986.72$),由直线的斜率和截距以及 $G = -RT \ln K_a$ 关系式可得包合物体系的表观热力学函数 H 、 S 、 G ,结果见表 1。

表 1 表观热力学常数

Table 1 Apparent thermodynamic constants

$t/$	T	$1/T$	$\ln K_a$	K_a	G	H	S
15	288	0.003 472	7.208 860	1 351.351	- 17.211 3		
20	293	0.003 413	6.948 578	1 041.667	- 16.877 9		
25	298	0.003 356	6.830 794	925.926	- 16.874 9	- 25.532	- 0.029 12
30	303	0.003 300	6.676 644	793.651	- 16.770 9		
35	308	0.003 247	6.477 366	650.256	- 16.538 8		

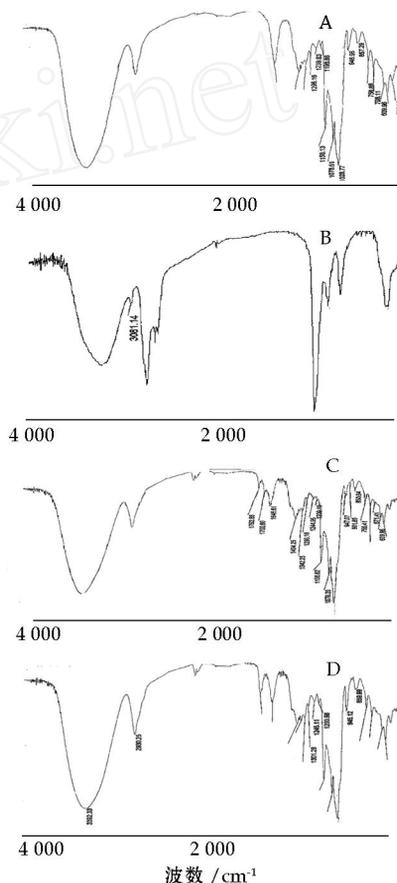
可见在上述 5 个温度范围内, G 均为负值,表明在常温及恒温条件下,包合反应可以自发进行。

H 为负值,表明 14-去氧穿心莲内酯与 α -环糊精形成包合物的过程为放热反应,适当降低温度有利于包合物的形成与稳定,这与稳定常数随温度降低而变大的结论是一致的;两个公式计算得到的 S 值相近似。

包合物的形成过程是主客体分子相互作用、相互识别的过程,其推动力为分子间作用力,分子间的作用力主要包括范德华力、氢键力、库仑力及疏水力等,14-去氧穿心莲内酯与 α -环糊精包合反应的推动力主要是范德华力($H < 0$,焓变控制为主)。因此,表观热力学参数值表明,在 14-去氧穿心莲内酯与 α -环糊精包合体系中,范德华力起主要作用,疏水作用力也起一定的作用。

2.5 包合物红外光谱的测定:采用 KBr 压片法分别测定 14-去氧穿心莲内酯、 α -环糊精、物理混合物和包合物的红外光谱,结果见图 2。可见 14-去氧穿心莲内酯与 α -环糊精的物理混合物与包合物相比,14-去氧穿心莲内酯的特征峰发生改变。在物理混合物中,14-去氧穿心莲内酯的羰基($-C=O$)振动和双键($-C=C$ 12,13) 振动吸收峰分别在 1752.88 、 1646.61 cm^{-1} ,而包合物的相应峰分别移到了 1751.33 、 1637.06 cm^{-1} ,向高波数方向移动,说明客体分子(14-去氧穿心莲内酯)的羰基 $-C=O$ 和双键($-C=C$ 12,13) 伸缩振动受到了限制,14-去氧穿心莲内酯中的五元内酯环很可能插入到了 α -环糊精的空腔中。物理混合物中 14-去氧穿心莲内酯十氢萘环上的双键($-C=C$ 8,17) 的伸缩振动和弯曲振动的吸收峰分别在 1700.60 、 850.64 cm^{-1} ,包合物的伸缩振动峰被掩盖,其弯曲振动峰移到 859.99 cm^{-1} ,向低波数方向移动,说明也受到了环糊精的

影响,证明了包合物的形成,同时说明包合部位可能为十氢萘环或五元内酯环。



A- α -环糊精 B-14-去氧穿心莲内酯 C-物理混合物 D-包合物
A- α -cyclodextrin B-14-deoxyandrographolide
C- physics mixture D- inclusion compound

图 2 红外光谱

Fig 2 Infrared spectrums

2.6 包合物氢核磁谱的测定:DMSO- d_6 作溶剂,分别测定 14-去氧穿心莲内酯、 α -环糊精、物理混合物和包合物的核磁共振谱,结果见表 2、3。可以看出,形成包合物后, α -环糊精的质子都向高场发生了移

动,而 14-去氧穿心莲内酯的质子大都向低场发生了较大的化学位移,但十氢萘环上的 18-H、3-OH、19-OH 的化学位移分别向高场移动 0.001 5、0.000 1、0.049 9,由此说明萘环及其支链上的氢原子受到屏蔽。可见形成包合物的主客体比例为 1 : 1,范德华力在包合过程中起主要作用,包合部位为十氢萘环及五元内酯环,形成的包合物常温下比较稳定。

表 2 包合物形成前后 β -环糊精的 ^1H NMR 化学位移变化
Table 2 ^1H NMR Chemical shift changes of β -cyclodextrin in inclusion compound and physic mixture

β -环糊精质子	β -环糊精	包合物	
H (1)	5.769 6	5.715 4	- 0.054 1
H (2)	3.357 2	3.255 4	- 0.101 8
H (3)	4.826 6	4.823 4	- 0.003 2
H (4)	3.308 4	3.156 2	- 0.152 2
H (5)	3.554 8	3.554 2	- 0.000 6
H (6)	3.617 0	3.616 9	- 0.000 1

3 讨论

14-去氧穿心莲内酯的十氢萘环和五元内酯环均有可能被包入 β -环糊精的空腔中,可能会产生两种 1 : 1 的包合物或一种 1 : 2 的包合物,Benesi Hildebrand 法测定包合比^[4];14-去氧穿心莲内酯与 β -环糊精形成的为 1 : 1 包合物,因此推断可能为两种

表 3 包合物形成前后 14-去氧穿心莲内酯的 ^1H NMR 化学位移变化

Table 3 ^1H NMR Chemicals shift changes of 14-deoxyandrographolide in inclusion compound and physic mixture

14-去氧穿心莲内酯质子	14-去氧穿心莲内酯	包合物	
9-H	2.315 9	2.329 7	0.013 8
14-H	7.465 9	7.467 2	0.0013
15-H	4.819 4	4.820 7	0.001 3
17-Ha	4.586 4	4.586 8	0.000 4
17-Hb	4.265 3	4.469 9	0.204 6
18-H	1.068 3	1.066 8	- 0.001 5
19-Ha	3.807 8	3.821 5	0.013 7
20-H	0.589 7	0.597 3	0.007 6
3-OH	5.053 2	5.053 1	- 0.000 1
19-OH	4.169 9	4.120 0	- 0.049 9

1 : 1 包合物,一种包含十氢萘环及其支链,另一种包含五元内酯环,包含产物为包含十氢萘环和五元内酯环的两种包合物的混合物,这与计算机模拟的结果相吻合。包合前采用 CAche 软件中的 Standard Procedure 程序,对 14-去氧穿心莲内酯- β -环糊精的分子结构进行了模拟。结果显示:14-去氧穿心莲内酯的五元内酯环及十氢萘环部分都能与 β -环糊精的空腔相匹配(图 3)。

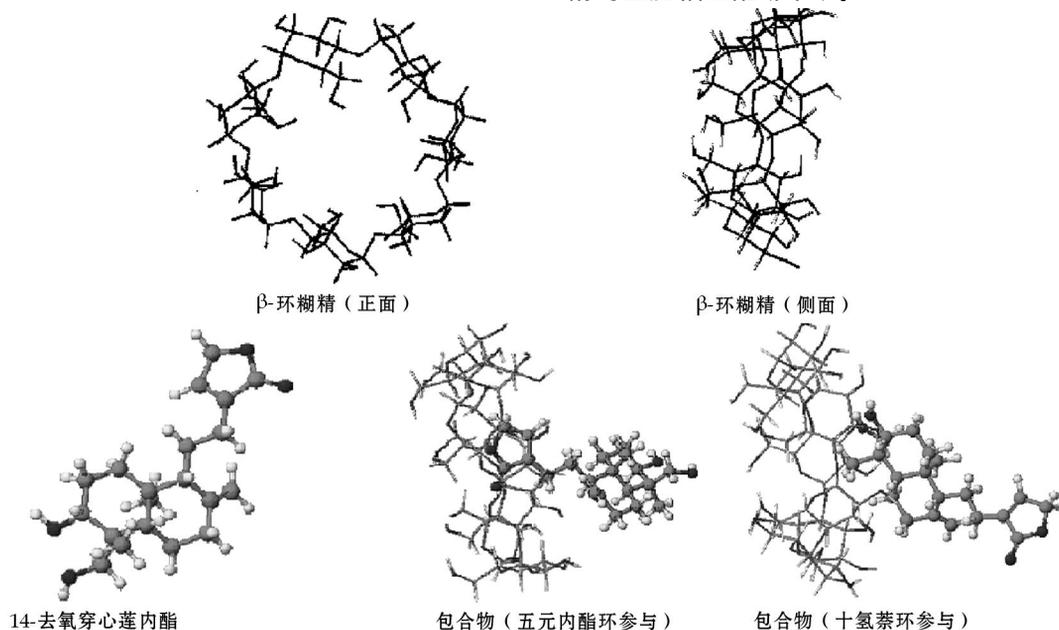


图 3 14-去氧穿心莲内酯- β -环糊精计算机模拟图

Fig 3 Simulation diagram of 14-deoxyandrographolide- β -cyclodextrin by computer

包合常数是衡量包合水平的一个重要参数。当 K_a 值为 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^5$ mol/L 时包合效果最好,太小不宜包合,太大则脱包合困难。14-去氧穿心莲内酯- β -环糊精的稳定常数 $K_a = 1\ 315.789$ L/mol,

说明 14-去氧穿心莲内酯可以和 β -环糊精发生包合,且稳定性较好,结果与计算机模拟相吻合。采用 CAche 软件中的 Standard Procedure 和半经验 MM3 力场计算法,计算了 14-去氧穿心莲内酯包合

前后体系的能量(表 4)。不论是五元内酯环还是十氢萘环与环糊精作用所形成的包合物的能量均比主客体孤立的处于同一个平面内未被包合状态下低,且均低于主客体能量的简单加合,说明 14-去氧穿心莲内酯与 β -环糊精形成包合物

表 4 14-去氧穿心莲内酯- β -环糊精包合过程的计算机模拟数据

Table 4 Simulation data of 14-deoxyandrographolide- β -cyclodextrin by computer

名称	SP(kcal/mol)	MM3(kcal/mol)
β -环糊精	427.7467	515.0426
14-去氧穿心莲内酯	53.3747	53.3732
1) + β -环糊精	488.6518	488.6329
1- β -环糊精	470.5519	488.6329
1- β -环糊精	477.6318	477.6381

可以在常温下进行,且形成的包合物常温下比较稳定。热力学常数 G 为负,也说明了包合反应可以在常温及恒温条件下自发进行。

参考文献:

- [1] 韩光,曾超,杜钢军,等. 穿心莲内酯衍生物的合成及其抗炎免疫活性[J]. 中草药,2006,37(12):1771-1775
- [2] Gerhard W. An overview of host-guest chemistry and its application to nonsteroid 14-deoxyandrographolide 1 anti-inflammatory drugs [J]. *Clin Drug Invest*, 2000, 19(2): 21.
- [3] 韩光,李景华. 14-去氧穿心莲内酯/ β -环糊精包合作用的研究[J]. 中南药学,2008,6(3):274-277.
- [4] Jara F, Mascayano C, Rezende M C, et al. A spectral and molecular dynamics simulation study of β -cyclodextrin inclusion complexes with solvatochromic dyes derived from barbituric acid [J]. *J Inclusion Phenomena Macrocyclic Chem*, 2006, 54: 95-99.

大鼠股静脉给药五味子酚的药动学研究

马晓琳,陈道峰*

(复旦大学药学院 生药学教研室,上海 200032)

摘要:目的 建立测定大鼠血浆中五味子酚浓度的 HPLC 方法,并对五味子酚在大鼠体内的药动学特征进行研究。方法 血浆样品经甲醇沉淀及乙醚萃取后,用 HPLC-DAD 进行测定分析。色谱柱为 Eclipse XDB-C₁₈ Agilent (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m),流动相为乙腈-水(65:35),检测波长 254 nm;测定大鼠静脉注射五味子酚 18 mg/kg 后的血药浓度,并利用 3P87 软件拟合其药动学参数。结果 五味子酚的血药浓度在 0.1~2.5 μ g/mL 线性关系良好($r^2=0.999$),最低检测限为 10 ng/mL,在 3 个浓度水平下,方法的回收率为 88%~110%,日间和日内 RSD 小于 15%,符合生物样品分析要求。大鼠股静脉注射 18 mg/kg 后,血药浓度-时间曲线呈二室模型。主要药动学参数 $t_{1/2}$ 、 $t_{1/2}$ 、 V 、AUC、MRT 分别为(0.22 ± 0.11) h、(1.19 ± 0.22) h、(12.81 ± 2.91) L/kg、(1.32 ± 0.19) μ g/mL/h、(1.51 ± 0.24) h。结论 该方法简便、快速、稳定可靠,适用于五味子酚的体内分析。

关键词:五味子酚;高效液相色谱法;药动学

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)02-0216-04

Pharmacokinetic study of schisanhenol via femoral intravenous administration in rats

MA Xiao-lin, CHEN Dao-feng

(Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for the determination of schisanhenol in plasma and to study the pharmacokinetics of schisanhenol in rats. **Methods** After sedimentation by methanol, plasma samples were then prepared based on a liquid-liquid extraction by ether. The extracted samples were analyzed by liquid chromatography. Schisanhenol was eluted on Eclipse XDB-C₁₈ Agilent (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) column, using a mobile phase of acetonitrile-H₂O (65:35), and detected at 254 nm. The plasma concentration of schisanhenol in rats was determined after iv administration of 18 mg/kg, and the data were processed with the pharmacokinetic software 3P87. **Results** Calibration curves were linear over 0.1—2.5 μ g/mL ($r^2=0.999$) and the LOD was 10 ng/mL. The recoveries of schisanhenol from plasma

* 收稿日期:2009-05-09

基金项目:教育部高校优秀青年教师奖励基金资助项目(1999-71);上海市教育发展基金资助项目(05SG06)

作者简介:马晓琳(1982—),女,上海人,硕士研究生,从事中药活性成分药动学研究。E-mail:menthama@gmail.com

*通讯作者 陈道峰 Tel:(021)54237453 Fax:(021)64170921 E-mail:dfchen@shmu.edu.cn