

延胡索乙素与 β -环糊精及其衍生物的包合行为研究

赵芳¹, 杨云汉¹, 赵雪秋¹, 杨俊丽¹, 杨丽¹, 叶艳青¹, 陈文², 杨丽娟^{1*}

1. 云南民族大学 化学与环境学院/民族药资源化学国家民委—教育部重点实验室, 云南 昆明 650500

2. 云南大学 教育部自然资源药物化学重点实验室, 云南 昆明 650091

摘要: **目的** 制备延胡索乙素与 β -环糊精及其衍生物的包合物, 并对其包合行为和性能进行研究。**方法** 通过饱和溶液法制备了延胡索乙素(THP)与 β -环糊精(β -CD)、羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)、二甲基- β -环糊精(DM- β -CD)和三甲基- β -环糊精(TM- β -CD)的包合物; 采用Job曲线法和紫外-可见光谱滴定法确定包合物的包合比和稳定常数; 利用X射线粉末衍射(XRD)、热重分析(TG)和扫描电子显微镜(SEM)对包合物进行表征; 运用分子对接探讨了THP与 β -CD及其衍生物的包合模式; 测定了包合物的水溶性, 在模拟人体胃液和肠液环境下进行了稳定性测试。**结果** THP与 β -CD及其衍生物的包合比均为1:1; 分子对接表明, THP从大口端进入并贯穿在 β -CD和DM- β -CD的空腔中, THP的2个芳香环分别位于大口端和小口端; 而对于HP- β -CD和TM- β -CD来说, THP的2个氮杂环呈“V”字型镶嵌到环糊精的空腔内, 且2个芳香环都位于环糊精的大口端。**结论** THP与 β -CD、HP- β -CD、DM- β -CD和TM- β -CD形成包合物后, 其溶解度从0.30 mg/mL分别提高到了1.60、3.40、9.13、4.02 mg/mL, 且其热稳定性及生物环境稳定性都得到明显提高。

关键词: 延胡索乙素; β -环糊精; 包合物; 分子对接; 水溶性; 稳定性; 饱和溶液法; 羟丙基- β -环糊精; 二甲基- β -环糊精; 三甲基- β -环糊精; Job曲线法; 紫外-可见光谱滴定法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)15-3609-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.15.020

Study on inclusion behavior and properties of tetrahydropalmatine with β -cyclodextrin and its derivatives

ZHAO Fang¹, YANG Yun-han¹, ZHAO Xue-qi¹, YANG Jun-li¹, YANG Li¹, YE Yan-qing¹, CHEN Wen², YANG Li-juan¹

1. Key Laboratory of Ethnic Medicine Resource Chemistry, State Ethnic Affairs Commission & Ministry of Education, School of Chemistry and Environment, Yunnan Minzu University, Kunming 650500, China

2. Key Laboratory of Medicinal Chemistry for Natural Resource, Ministry of Education, Yunnan University, Kunming 650091, China

Abstract: **Objective** To prepare tetrahydropalmatine (THP) and β -cyclodextrin (β -CD) and its derivatives inclusion complexes (HP- β -CD, DM- β -CD, and TM- β -CD) and explore their inclusion behavior and properties. **Methods** The inclusion complexes of THP with β -CD, HP- β -CD, DM- β -CD, and TM- β -CD were prepared by saturated solution. The inclusion ratio and stability constant of inclusion complexes were determined with the Job plot and UV-vis spectroscopy. The THP/CDs complexes were characterized and determined by means of XRD, TG, and SEM. The molecular simulation was processed to investigate the inclusion behavior of THP and different CDs. The water solubility of the inclusion complexes was measured and the stability test was conducted in the simulated human gastric juice and intestinal fluid environment. **Results** Job plot and UV-vis spectroscopy showed that inclusion ratio of host-guest inclusion complexes was 1:1. Molecular docking showed that the entire THP entered the macrophage port and run through the cavities of β -CD and DM- β -CD, with the two aromatic rings located at the large and small mouth, respectively. For HP- β -CD and TM- β -CD, the two nitrogen heterocycle of THP were “V” shaped inlaid into the CD cavity, and both aromatic rings were located at the large end of the CDs. **Conclusion** The solubility of tetrahydropalmatine was increased from 0.30 mg/mL to 1.60, 3.40, 9.13, and 4.02 mg/mL for β -CD, HP- β -CD, DM- β -CD, and TM- β -CD, respectively. The thermal stability and biological environment stability had

收稿日期: 2018-03-18

基金项目: 国家自然科学基金项目资助(21762051, 21562048)

作者简介: 赵芳(1993—), 女, 在读硕士, 研究方向为药物分析化学。E-mail: 2232550275@qq.com

*通信作者 杨丽娟(1971—), 女, 白族, 硕士生导师, 教授, 研究方向为药物化学。Tel: (0871)65910017 E-mail: yangljyang@sina.com

been significantly improved.

Key words: tetrahydropalmatine; β -cyclodextrin; inclusion complex; molecule docking; solubility; stability; saturated solution; hydroxypropyl- β -cyclodextrin; dimethyl- β -cyclodextrin; trimethyl- β -cyclodextrin; Job plot; UV-vis spectroscopy

从罂粟科紫堇属延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎中提取分离出来的主要成分延胡索乙素 ($C_{21}H_{25}NO_4$, tetrahydropalmatine, 简称 THP)^[1-2], 属于异喹啉类生物碱。经研究发现, THP 具有显著的止痛、镇静、催眠^[3]、抗焦虑^[4]、降血压^[5-6]和保护神经^[7]等作用。除此之外, 还具有促进肾上腺分泌^[8]、抗氧化、抗病毒和抗炎活性^[9-10]。但是, THP 的水溶性和稳定性较差^[11-12], 影响了其作为药剂使用时的吸收效果, 因而在临床应用方面受到了极大的限制^[13-14]。 β -环糊精 (β -CD)、羟丙基- β -环糊精 (HP- β -CD)、二甲基- β -环糊精 (DM- β -CD) 和三甲基- β -环糊精 (TM- β -CD) 作为一种药物辅料, 能很好地改善药物的水溶性和稳定性^[15-23]。本研究制备了 THP 与 β -CD 及其衍生物的包合物, 采用热重分析 (TG)、X 射线粉末衍射 (XRD) 和扫描电子显微镜 (SEM) 进行表征, 运用分子对接技术探讨了 THP 与 β -CD 及其衍生物的包合模式, 并初步考察了 β -CD 及其衍生物对 THP 水溶性和稳定性改善的差异。根据文献报道, 将来 THP/环糊精包合物可以制成胶囊^[24]、片剂^[25]、贴膏剂^[26]或者静脉注射剂^[27]进行给药。

1 仪器与材料

Agilent 8453 紫外-可见分光光度计, 美国安捷伦公司; STA449F3 热重分析仪, 德国耐驰公司; 转靶 X 射线衍射仪, 日本理学公司, TTR 18kW 铜靶; Quanta 200 扫描电子显微镜, 美国 FEI 公司。

THP, 质量分数 >98%, 批号 I1523072, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; HP- β -CD (批号 LI80Q20)、 β -CD (批号 LEB0Q21)、DM- β -CD (批号 L330P17) 和 TM- β -CD (批号 BM5CI-E0), 北京百灵威科技有限公司; 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 光谱测定

2.1.1 THP 的标准曲线 分别配制浓度为 0.036、0.052、0.068、0.084、0.100、0.116、0.132、0.148 mmol/L 的 THP 甲醇溶液, 并在最大吸收波长 282 nm 处测定紫外吸收。然后分别以浓度 (C) 和吸光度 (A) 值作图, 得到标准曲线。其线性方程为 $A = 6.5049C + 0.00222$, $r = 0.99945$ ($n = 8$)。

2.1.2 Job 曲线测定 运用 Job 法^[28]可以确定 THP 与 β -CD 及其衍生物包合物的化学计量比。维持 THP 和 β -CD 及其衍生物的总浓度为 0.088 mmol/L, 在 pH 3.0 的缓冲溶液中分别配制一系列浓度的 THP 与 β -CD 及其衍生物混合液, 使两者的物质的量之比在 0~1 变化^[28-29], 然后在 282 nm 处测定 A 值。根据图 1 中曲线的最高点为 0.5, 可以判断出 THP 与 β -CD 及其衍生物包合物的包合比都是 1:1。

2.1.3 紫外-可见光谱滴定实验 固定 THP 的浓度 (0.08 mmol/L) 不变, 在 0~4.00 mmol/L 改变 β -CD 及其衍生物的浓度 (β -CD pH 值 3.0: 0.00、0.16、0.32、0.47、0.67、0.96、2.80 mmol/L, pH 值 10.5: 0.00、0.16、0.23、0.32、0.47、0.67、0.96、1.37 mmol/L; HP- β -CD pH 值 3.0: 0.00、0.16、0.23、0.32、0.47、0.67、0.96、1.37、2.80、4.00 mmol/L, pH 值 10.5: 0.00、0.08、0.11、0.16、0.23、0.32、0.67、0.96、1.37、1.96 mmol/L; DM- β -CD pH 值 3.0: 0.00、0.11、0.16、0.32、0.47、0.67、0.96 mmol/L, pH 值 10.5: 0.00、0.32、0.47、0.67、0.96、1.37、2.80、4.00 mmol/L; TM- β -CD pH 值 3.0: 0.00、0.16、0.23、0.47、0.67、0.96、1.37、1.96、2.80、4.00 mmol/L, pH 值 10.5: 0.00、0.11、0.16、0.23、0.32、0.47、0.67、0.96、1.37 mmol/L), 用体积比为 1:4 的甲醇和 pH 为 3.0、10.5 缓冲溶液混合定容, 测定紫外-可见吸收光谱, 得到 THP 与 β -CD 及其衍生物包合物的紫外-可见光谱滴定图 (图 2)。所有实验平行测定 3 次。

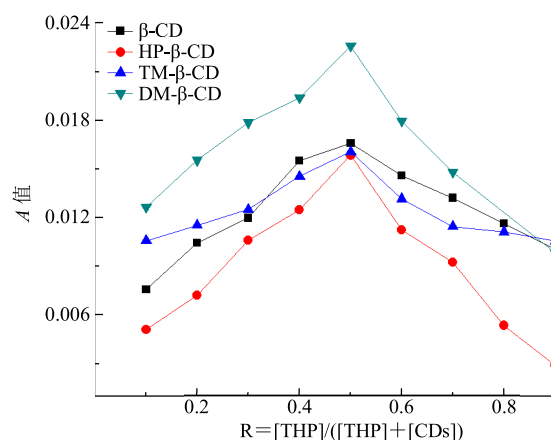
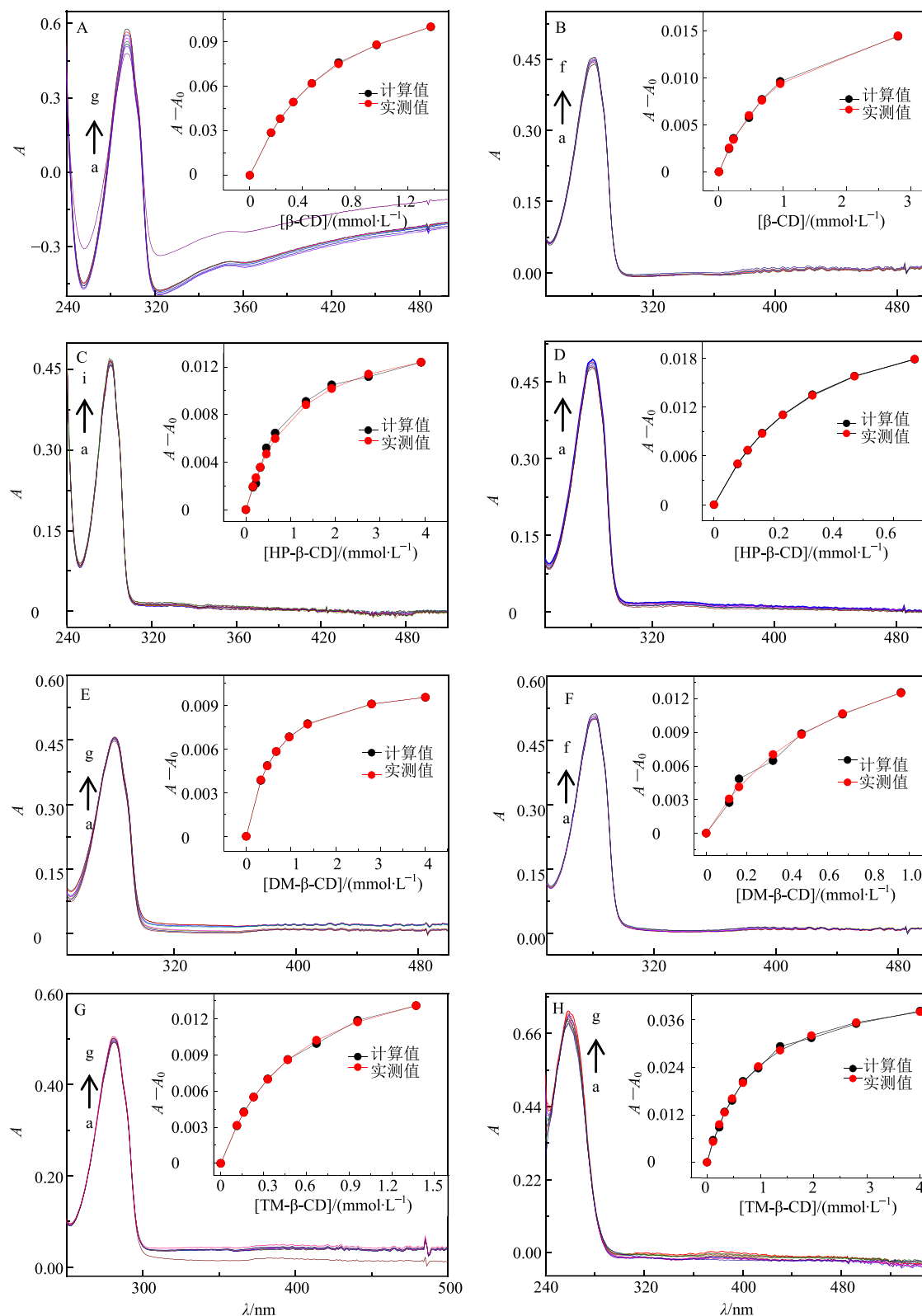


图 1 THP 与 β -CD 及其衍生物包合物在 pH 3.0 中的 Job 曲线

Fig. 1 Job plots for THP and β -CD and its derivatives complex at pH 3.0



a→i-β-CD 及其衍生物浓度 插图为计算包合物热力学变化的非线性最小二乘拟合曲线

a→i-concentration of β-CD and its derivatives illustration was the nonlinear least-squares analysis (inset) to calculate thermodynamic changes of complex

图 2 THP 在 pH 10.5 (A、C、E 和 G 图) 和 pH 3.0 (B、D、F 和 H 图) 缓冲溶液中与不同环糊精的紫外-可见光谱滴定图
Fig. 2 UV-Vis spectral titration diagram of THP with different cyclodextrin at pH 10.5 (A, C, E, and G) and pH 3.0 (B, D, F, and H) buffer solution

先假设 THP 与 β -CD 及其衍生物 (CDs) 包含物按 1:1 进行包含, 则 THP 与环糊精的包含反应方程式可表示为 $\text{THP} + \text{CDs} \rightleftharpoons \text{THP} \cdot \text{CDs}$ 。

根据朗伯-比尔定律, 有 $[\text{THP} \cdot \text{CDs}] = \Delta A / \Delta \varepsilon$, 则得出稳定常数 (K_s) 为

$$K_s = (\Delta A / \Delta \varepsilon) / \{([\text{THP}]_0 - \Delta A / \Delta \varepsilon)([\text{CDs}]_0 - \Delta A / \Delta \varepsilon)\}$$

ΔA 表示有无 CDs 存在下 THP 的 A 值变化, $\Delta \varepsilon$ 表示有无 CDs 存在下 THP 的摩尔消光系数的差值; $[\text{THP}]_0$ 表示 THP 的原始浓度; $[\text{CDs}]_0$ 表示 CDs 的浓度

最后, 计算得到不同 pH 值下 THP 与 β -CD 及其衍生物包含物的 K_s 和吉布斯自由能变化 ($-\Delta G^\circ$) (表 1)。从图 2 明显看出, 实验值与理论值具有良好的线性匹配, 说明以上假设成立, 即 THP 与 β -CD 及其衍生物都是按 1:1 进行包含的, 这与 Job 曲线得到的结果一致。

表 1 THP 与 β -CD 及其衍生物在 pH 3.0 和 pH 10.5 中的 K_s 和 $-\Delta G^\circ$

Table 1 K_s and $-\Delta G^\circ$ for inclusion complexation of THP with β -cyclodextrin and its derivatives in pH 3.0 and pH 10.5

主体	pH 值	K_s/mol^{-1}	$\lg K_s$	$-\Delta G^\circ/(\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
β -CD	3.0	955	2.979 5	17.009
	10.5	1 719	3.234 7	18.466
HP- β -CD	3.0	1 222	3.086 5	17.620
	10.5	2 096	3.320 8	18.957
DM- β -CD	3.0	1 744	3.241 0	18.502
	10.5	1 835	3.263 0	18.628
TM- β -CD	3.0	1 219	3.085 4	17.614
	10.5	2 216	3.345 0	19.095

2.2 包含物的制备与表征

2.2.1 THP 与 β -CD 及其衍生物包含物的制备 分别准确称取 THP 3.6 mg、 β -CD 22.7 mg、HP- β -CD 29.2 mg、DM- β -CD 26.6 mg 和 TM- β -CD 28.6 mg 于 25 mL 圆底烧瓶, 加入 2 mL 甲醇和 8 mL 水, 室温下避光搅拌 1 周, 然后用 0.45 μm 微孔膜滤过, 减压蒸馏, 并于 50 $^\circ\text{C}$ 下真空干燥, 即得黄色固体包含物。

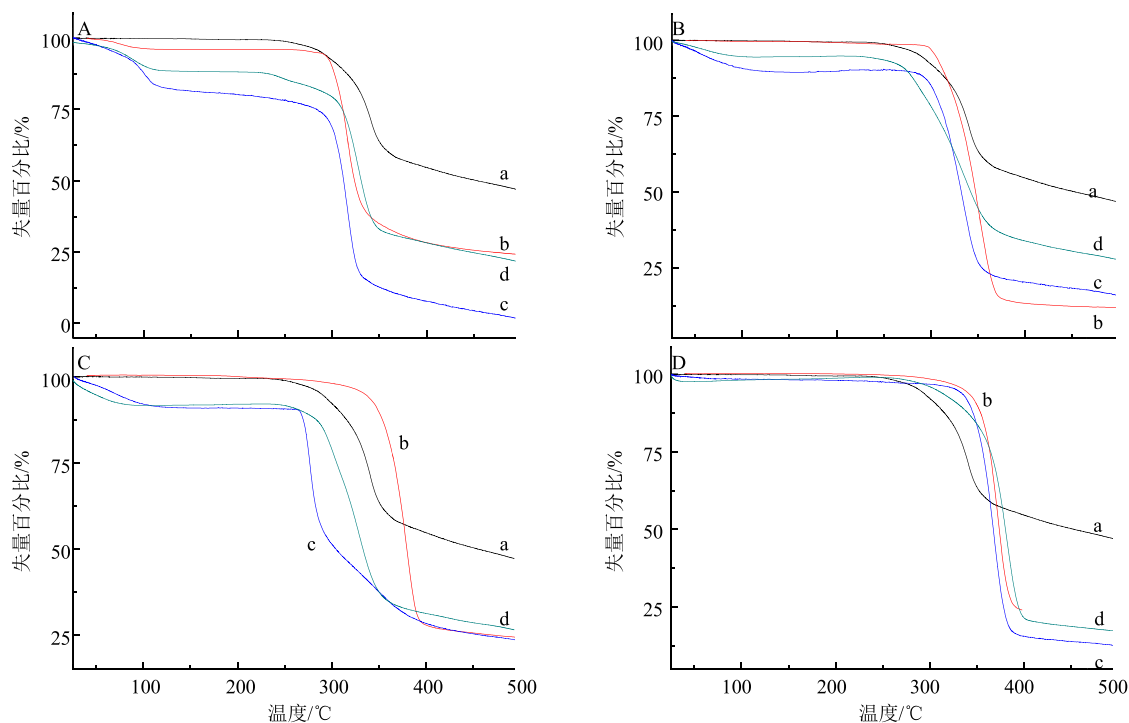
2.2.2 THP 与 β -CD 及其衍生物的物理混合物制备 按物质的量比 1:1 准确称取 THP 和 β -CD 及其衍生物, 使其充分混合均匀, 备用。

2.2.3 热重分析 (TG) 分别准确称取样品 THP、THP/ β -CD 包含物、THP/HP- β -CD 包含物、THP/DM- β -CD 包含物和 THP/TM- β -CD 包含物 9.5、3.1、

2.8、7.2、4.0 mg。在 N_2 流 70 mL/min 下, 设置升温速率为 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$, 升温范围 25~500 $^\circ\text{C}$ 。从图 3 TG 曲线中可得出, THP 的分解温度是 263.31 $^\circ\text{C}$, β -CD、HP- β -CD、DM- β -CD 和 TM- β -CD 的分解温度分别在 282.03、297.03、302.03、310.01 $^\circ\text{C}$, 而各自的物理混合物则分别在 238.82、243.11、238.69、291.04 $^\circ\text{C}$ 开始出现拐点, 并且拐点温度都低于药物分子和环糊精分子的分解温度。与之相比, 其包含物的分解温度均有很大的提高, 分别为 277.39、288.59、270.42、320.71 $^\circ\text{C}$ 。从包含物与主体、客体 and 物理混合物分解温度的明显差异可以判断, THP 与 β -CD 及其衍生物均形成了包含物, 并且形成的包含物热分解温度得到了提高。

2.2.4 X 射线粉末衍射分析 (XRD) 分别称取一定量的样品, 设置实验条件为 Cu $K\alpha$ ($K=1$ 546.0 nm, 100 mA, 40 kV, 扫描速率 5 $^\circ/\text{min}$, 在 2θ 3 $^\circ$ ~50 $^\circ$ 进行扫描, 得到如图 4 所示的 XRD 图。图中 THP、 β -CD、DM- β -CD 和 TM- β -CD (图 4-a、b) 呈晶型结构, 它们的明显特征峰分别出现在 2θ : 2.03 $^\circ$ 、6.10 $^\circ$ 、7.32 $^\circ$ 、10.30 $^\circ$ 、8.18 $^\circ$ ~10.90 $^\circ$ 处, HP- β -CD 呈无定形结构。它们的包含物晶型在不同程度上均发生了变化, 其中 THP/ β -CD 包含物在 2θ : 12.66 $^\circ$ 处出现 1 个尖锐的、强度较高的特征峰; THP/HP- β -CD 包含物跟 HP- β -CD 一样都呈无定形状, 但 HP- β -CD 在 2θ : 15.00 $^\circ$ ~35.00 $^\circ$ 出现 1 个宽大的特征峰, 而 THP/HP- β -CD 包含物的特征峰则出现在 2θ : 15.00 $^\circ$ ~22.00 $^\circ$, 峰型和强度明显区别于 HP- β -CD; THP/DM- β -CD 包含物则呈光晕状的无定形态; THP/TM- β -CD 包含物呈晶型状, 在 2θ : 8.36 $^\circ$ 处出现 1 个强度明显低于 TM- β -CD 的峰, 并且其在 2θ : 16.00 $^\circ$ ~30.00 $^\circ$ 处峰形趋于平缓。而它们的物理混合物则呈现晶型和不定型 2 种结构, 峰的强度极高, 并且其特征峰与各自的包含物明显不同。经过对比包含前后的 XRD 谱图可以验证, THP 与 β -CD 及其衍生物形成的包含物在结构上发生了不同程度的变化。

2.2.5 扫描电子显微镜分析 (SEM) 从图 5 可以看出, THP 呈大小不同的块状晶体, β -CD、HP- β -CD、DM- β -CD 和 TM- β -CD 分别呈棒状、带孔的球状、带孔空心球状和带孔的片状晶体, 它们的物理混合物均存在这 2 种物质的晶体结构, 似 2 种物质的简单混合, 而包含物都是表面附着一些白色细小颗粒的块状晶体。但不同主体环糊精的包含物又具



a-THP b-不同环糊精 c-不同体系的包合物 d-不同体系的物理混合物, 图 4、5 同

a-THP b-different CDs c-different inclusion complex systems d-different physical mixture systems, same as Fig. 4 and 5

图 3 β-CD 体系 (A)、HP-β-CD 体系 (B)、DM-β-CD 体系 (C) 和 TM-β-CD 体系 (D) 的 TG 曲线

Fig. 3 TG curve of β-CD system (A), HP-β-CD system (B), DM-β-CD system (C), and TM-β-CD system (D)

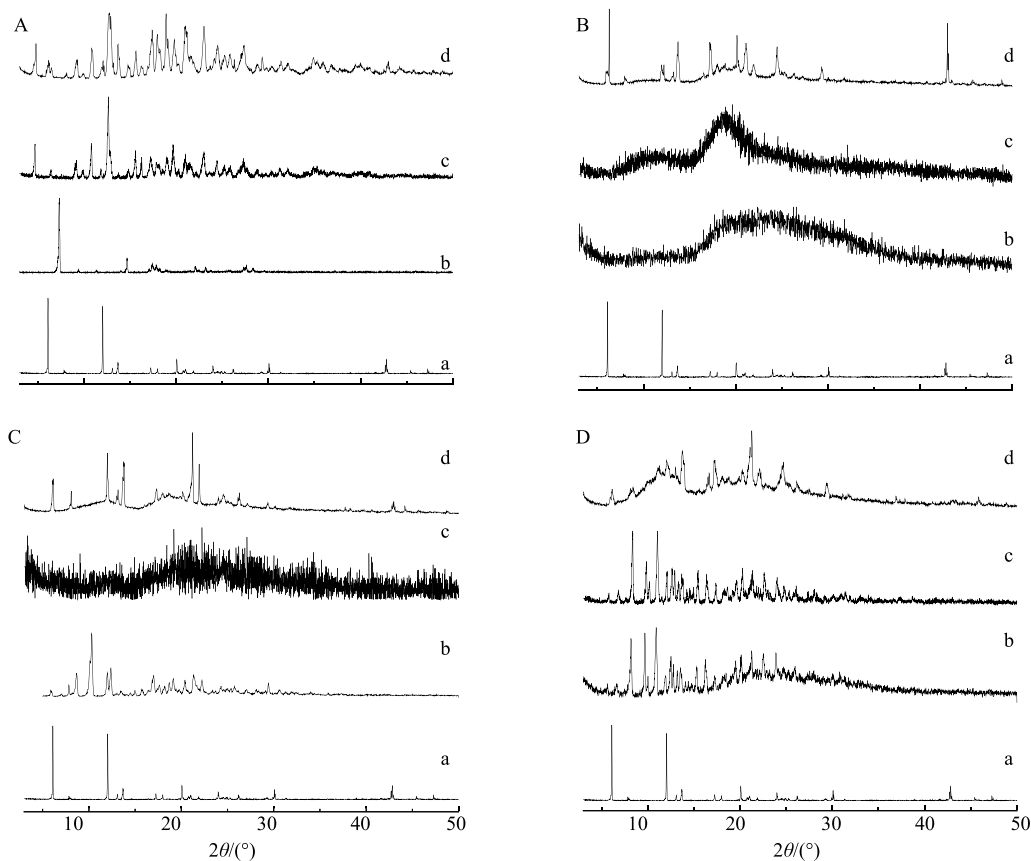


图 4 β-CD 体系 (A)、HP-β-CD 体系 (B)、DM-β-CD 体系 (C) 和 TM-β-CD 体系 (D) 的 XRD 图

Fig. 4 XRD patterns of β-CD system (A), HP-β-CD system (B), DM-β-CD system (C), and TM-β-CD system (D)

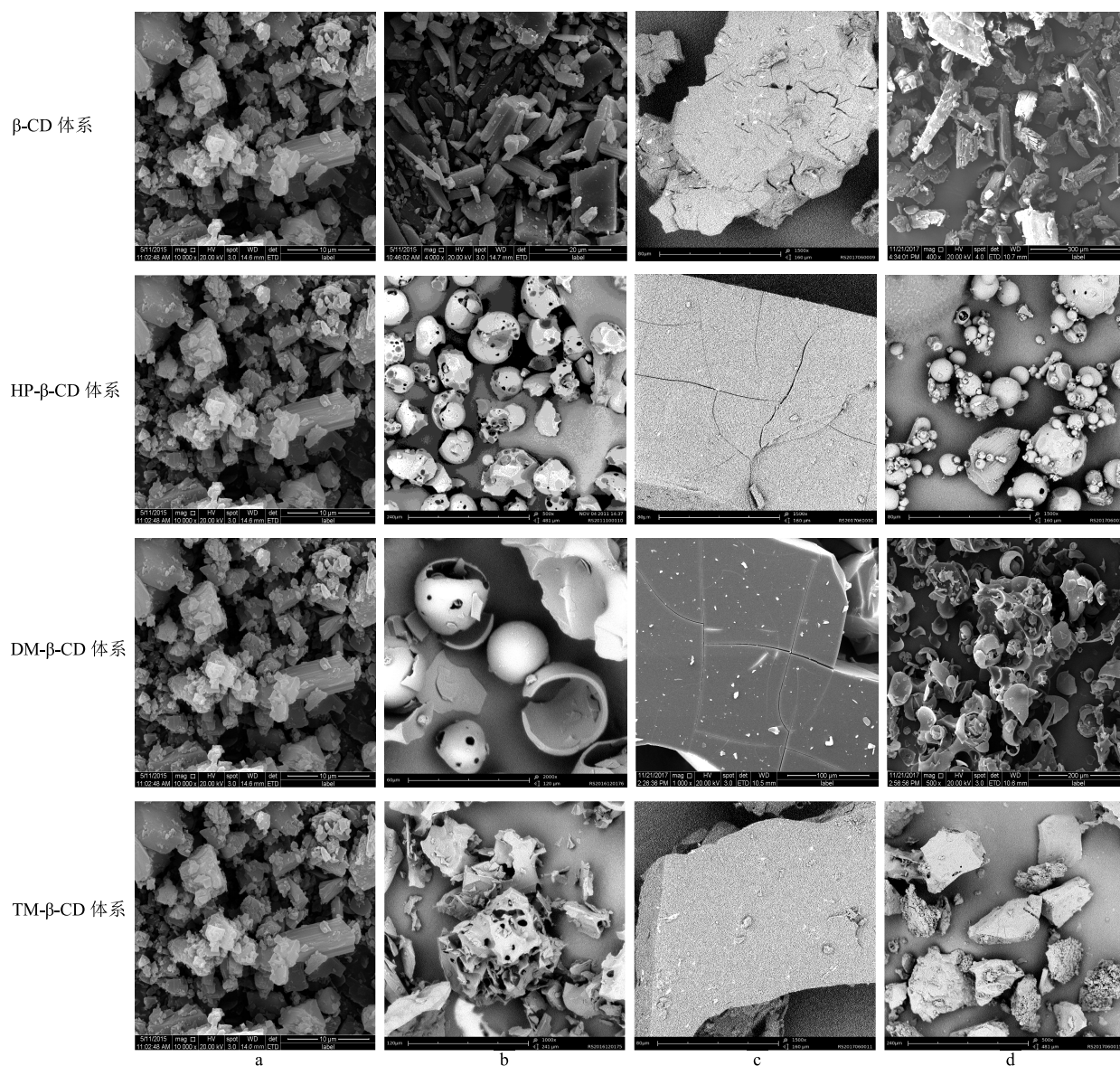


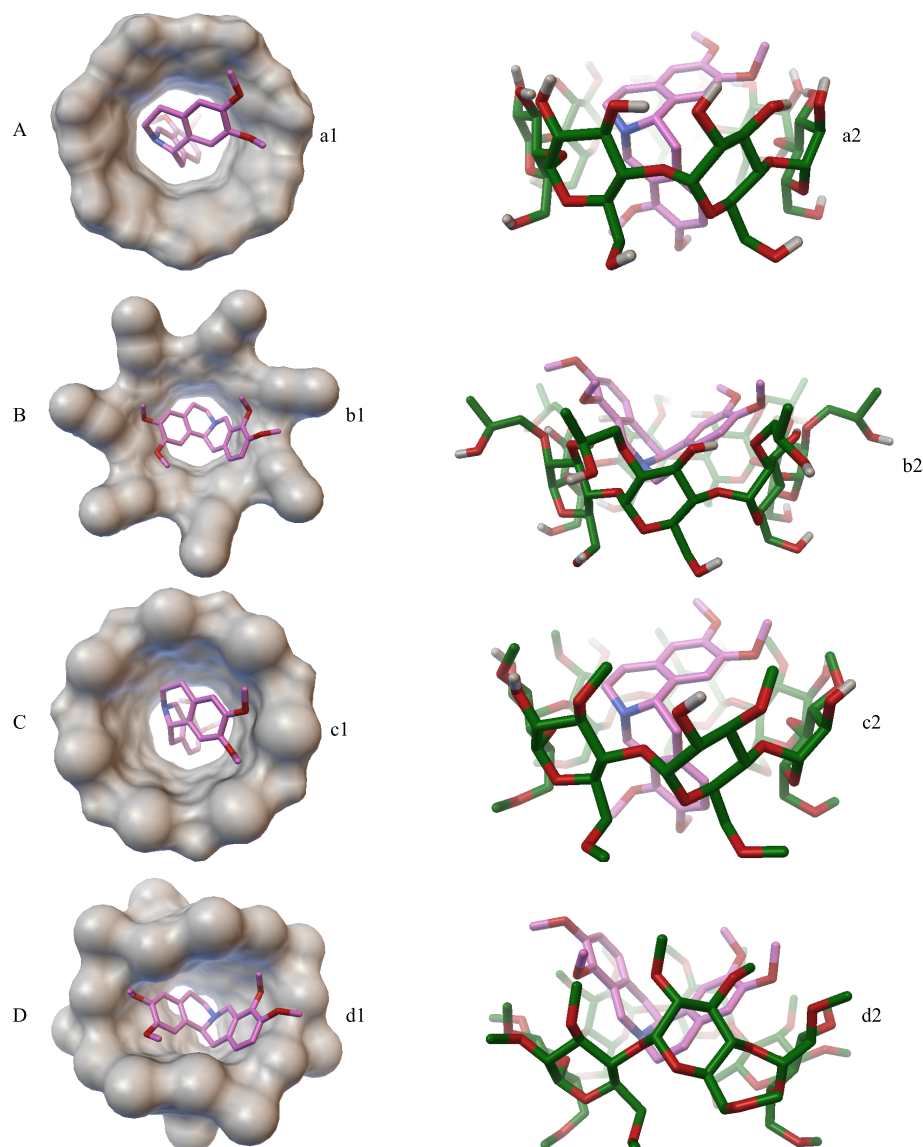
图 5 THP 与环糊精包合物体系的 SEM 图

Fig. 5 SEM micrographs of THP with CDs inclusion complex system

有不同的形貌特征, 其中 THP/ β -CD 包合物呈不规则的块状, THP/DM- β -CD 包合物的表面更加的光滑, THP/TM- β -CD 包合物的表面无裂痕。这些明显的变化说明了 THP 和 β -CD 及其衍生物均形成了包合物, 并且形成包合物后, 其表面晶形结构都发生了变化。

2.2.6 THP 与 β -CD 及其衍生物的对接 分子对接在研究主客体分子络合方面有着广泛的应用^[30-32]。首先在 Gaussian View 中构建 THP 和 β -CD 及其衍生物的结构, 采用半经验 PM3 方法在无任何限制性因素的条件下进行优化, 直至矩阵分析无虚频, 证明优化后的分子构象处于最小能量状态。所有的量化计算均在 Gaussian 03^[33]软件包中完成。再应用

AutoDock 4.2 程序^[34], 将 THP 分子对接到 β -CD 及其衍生物的空腔中。采用半柔性对接法, 以环糊精作为刚性受体、配体 THP 分子允许柔性扭转, 采用拉马克遗传算法, 执行 50 次构象搜索, 然后通过聚类分析得到一系列 THP 与 β -CD 及其衍生物的结合能。根据结合能越低, 亲和力越大, 构象越稳定, 最后分别给出 THP 与 β -CD、HP- β -CD、DM- β -CD 和 TM- β -CD 在结合能为 -5.14、-6.53、-5.83、-6.93 kcal/mol 的稳定构象(图 6)。结果表明, THP 与 β -CD 及其衍生物之间的最大相互作用力是范德华力, 其最稳定的结合模式都是 THP 从 β -CD 及其衍生物的大口端进入空腔。而不同的是, 整个 THP 贯穿在 β -CD 和 DM- β -CD 的空腔中, 并且 2 个芳香环分别



A-THP/ β -CD 包合物 B-THP/HP- β -CD 包合物 C-THP/DM- β -CD 包合物 D-THP/TM- β -CD 包合物 a1~d1 表示包合模型的俯视图 a2~d2 表示包合构象的主视图
A-THP/ β -CD complex B-THP/HP- β -CD complex C-THP/DM- β -CD complex D-THP/TM- β -CD complex a1—d1 represent top view of inclusion model a2—d2 represent front view of inclusion conformation

图 6 THP/ β -CD 及其衍生物包合物的优化构象图

Fig. 6 Optimized conformation between THP and β -cyclodextrin and its derivatives inclusion complex systems

位于大口端和小口端；对于 HP- β -CD 和 TM- β -CD 来说，THP 的 2 个氮杂环呈“V”字型镶嵌到环糊精的空腔内，而 2 个芳香环都位于环糊精的大口端。

2.3 包合物的性能研究

2.3.1 THP 与 β -CD 及其衍生物包合物的水溶性测试 通过制备饱和溶液的方法^[35]来测定 THP 及其包合物在水溶液中的溶解度。将过量的 THP 及其包合物投入 2 mL 水中(pH 值约为 7.0)，避光搅拌 3 h，滤过后减压蒸馏，再真空干燥计算其溶解度。最终经过计算得到 THP/ β -CD、THP/HP- β -CD、THP/

DM- β -CD 和 THP/TM- β -CD 4 种包合物中 THP 的溶解度分别为 1.60、3.40、9.13、4.02 mg/mL，而按照同样的方法测定得到 THP 的溶解度为 0.30 mg/mL。相比较而言， β -CD、HP- β -CD、DM- β -CD 和 TM- β -CD 使 THP 的溶解度分别提高至 5.3、11.3、30.4、13.4 倍，这说明形成包合物后 THP 的溶解性得到明显提高。

2.3.2 THP 与 β -CD 及其衍生物包合物的稳定性测试 为了进一步探讨 β -CD 及其衍生物作为 THP 载体的负载能力，本研究对 THP 形成 4 种包合物后的

稳定性进行了考察。在模拟人体胃液 (pH 1.5) 和肠液 (pH 7.6) 环境的条件下, 测定了 THP 与 β -CD 及其衍生物包合物的分解情况, 如图 7 所示, 其中 A 为每 (12 $\pm$ 2) h 内所测吸光度, A_0 为原始吸光度。具体操作是: 准备 10 个 25 mL 棕色量瓶, 都加入一定体积的 THP 溶液, 然后在另外 8 个量瓶中加入适量 β -CD 及其衍生物, 用体积比为 1:4 的甲醇和 pH 1.5、7.6 的缓冲溶液定容。待溶液静置一段时间后, 于最大吸收波长下每隔 (12 $\pm$ 2) h 测定 1 次 A 值。所有实验平行测定 3 次。

从图 7 可看出, 无论在酸性还是在弱碱性环境下, THP 溶液的紫外吸收均随着时间的增加而逐渐减弱, 这表明在一定程度下 THP 会慢慢分解。而相比 THP 与 β -CD 及其衍生物的包合物来看, 其在相

同条件下吸光度变化较小, 这表明 THP 与环糊精形成包合后, 其稳定性得到提高。在酸性环境 pH 1.5 中, THP/ β -CD 包合物、THP/HP- β -CD 包合物和 THP/DM- β -CD 包合物的紫外吸收一直呈上升趋势, 说明这几种包合物对 THP 的稳定性改善效果比较好; 而相比 THP/TM- β -CD 包合物而言, 其紫外吸收曲线随着时间的增加波动比较大, 但最终 THP 的含量只下降了 4.59%, 而没有与环糊精进行包合的 THP 最终下降了 8.01%。而在偏碱性环境中, 从紫外吸收变化的不同情况表明 THP 与不同的环糊精包合物均在不同程度上对 THP 的稳定性有提高。因此, 可以证实 THP 与环糊精进行包合后, 稳定性都有不同程度的改善, 这也说明了环糊精作为药物载体的优势。

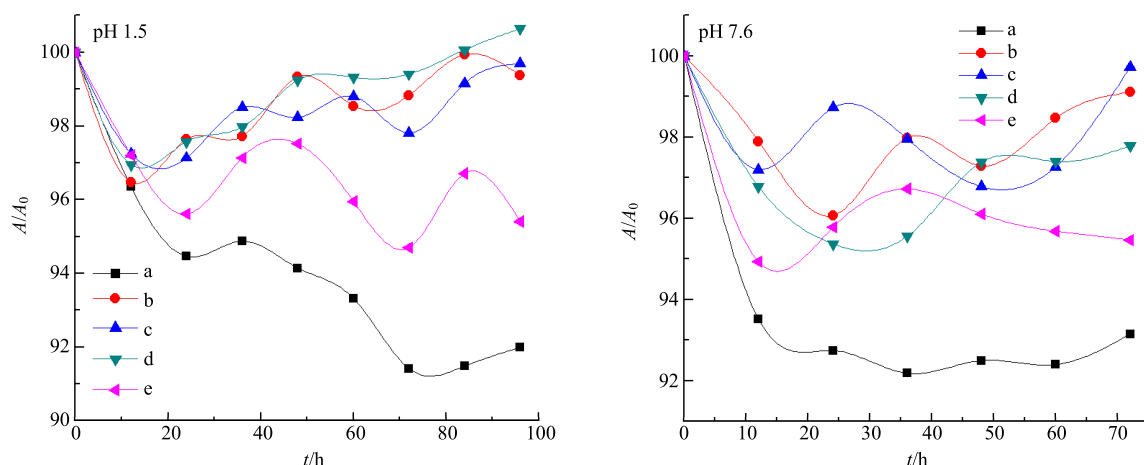


图 7 THP (a)、THP/ β -CD 包合物 (b)、THP/HP- β -CD 包合物 (c)、THP/DM- β -CD 包合物 (d) 和 THP/TM- β -CD 包合物 (e) 在 pH 1.5、7.6 中的相对吸光度 (A/A_0) 随时间变化的曲线图

Fig. 7 Relative values (A/A_0) of THP (a), THP/ β -CD complex (b), THP/HP- β -CD complex (c), THP/DM- β -CD complex (d), and THP/TM- β -CD complex (e) at pH 1.5 and pH 7.6

3 讨论

通过对 THP 与 β -CD 及其衍生物 (β -CD、HP- β -CD、DM- β -CD 和 TM- β -CD) 之间形成的配位包合物的包合行为进行研究, 相比而言, THP 与 β -CD 及其衍生物在碱性环境下的稳定常数比酸性环境下更大, 说明 THP 在碱性环境下更容易与环糊精进行包合。并且不同的环糊精与 THP 的稳定常数也不同, 其呈现如下规律: TM- β -CD > HP- β -CD > DM- β -CD > β -CD。根据文献报道环糊精中甲基化基团的存在使其环境更具疏水性, 更利于客体分子在环糊精空腔中的适应性^[36-38], 而 HP- β -CD 中的羟基链可能更容易与 THP 分子形成相互作用力, 因此甲基化环糊精与客体分子形成的稳定常数比 β -CD 的要大。

这也说明随着环糊精取代度的增加, 包结能力也增加。水溶性实验表明, THP 与不同的环糊精包合后, 使得 THP 的溶解度增大, 其大小顺序为 DM- β -CD > TM- β -CD > HP- β -CD > β -CD。这可能是由于环糊精本身的性质造成的, 因为 β -CD 的结构刚性较强, 分子间易形成氢键, 导致水溶性比较低。而 DM- β -CD、TM- β -CD 和 HP- β -CD 则是在 β -CD 分子的基础上将 2-H 或者 6-H 取代成甲基或羟丙基, 取代基团的变化导致环糊精的结构也发生了变化, 使得其水溶性得到增强, 因此, β -CD 包合物的水溶性是最低的, 而甲基或羟丙基取代后的环糊精相对较高。该结论与文献报道^[39]的水溶性规律相似。

通过 TG、XRD 和 SEM 的表征, 从包合前后

主客体的热性质和晶体形貌等宏观的角度发现,包合物与主客体 and 物理混合物之间存在着显著的差异,具备了新的热性质和晶体形貌,这些现象共同验证了包合物的形成;另外,采用分子对接模拟从微观上说明了客体分子 THP 都是从 β -CD 及其衍生物的大口端进入空腔,其中贡献最大的弱相互作用力是范德华力。

本研究对包合物水溶性和稳定性进行的考察,虽然在一定程度上说明了环糊精对 THP 水溶性、稳定性提高的优势,但要在制剂方面得到更广泛的应用,生物利用度的考察还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 张铁军,许浚,韩彦琪,等. 中药质量标志物(Q-marker)研究:延胡索质量评价及质量标准研究[J]. 中草药,2016,47(9):1458-1467.
- [2] 王磊,王媛,李爱主,等. 基于靶细胞萃取的延胡索药效成分的筛选和含量测定[J]. 药物评价研究,2016,39(6):990-994.
- [3] Hsu B, Kin K C. Pharmacological study of tetrahydropalmatine and its analogs. A new type of central depressants [J]. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1962, 139: 318-327.
- [4] Leung W C, Zheng H, Huen M, et al. Anxiolytic-like action of orally administered *dl*-tetrahydropalmatine in elevated plus-maze [J]. *Prog Neuro-psychoph*, 2003, 27(5): 775-779.
- [5] Lin M T, Chueh F Y, Hsieh M T, et al. Antihypertensive effects of *dl*-tetrahydropalmatine: An active principle isolated from *Corydalis* [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1996, 23(8): 738-745.
- [6] Chueh F Y, Hsieh M T, Chen C F, et al. *DL*-tetrahydropalmatine-produced hypotension and bradycardia in rats through the inhibition of central nervous dopaminergic mechanisms [J]. *Pharmacology*, 1995, 51(4): 237-244.
- [7] Chang C K, Chueh F M, Hsieh M T, et al. The neuroprotective effect of *dl*-tetrahydropalmatine in rat heatstroke [J]. *Neurosci Lett*, 1999, 267(2): 109-112.
- [8] 李惠芬,刘芳,朱丽丽. RP-HPLC 法测定延胡索及其制剂元胡止痛片中延胡索乙素 [J]. 中草药,2006,37(12): 1811-1813.
- [9] Zhu X Z. Development of natural products as drugs acting on central nervous system [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1991, 86(suppl 2): 173-175.
- [10] Han Y, Zhang W, Tang Y, et al. *l*-Tetrahydropalmatine, an active component of *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang, protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury in rats [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38627.
- [11] 梁卓,孙艺丹,王锐利,等. 延胡索乙素在不同溶剂中平衡溶解度及其油水分配系数的测定 [J]. 中国药物与临床,2012,12(8): 984-986.
- [12] 吴芸,陈志鹏,肖璐,等. 延胡索乙素平衡溶解度及表观油水分配系数的测定 [J]. 南京中医药大学学报,2012,28(2): 178-180.
- [13] 施婷婷,洪超,韩丽妹,等. 元胡止痛方两种有效组分固体分散体的制备与评价 [J]. 中国医药工业杂志,2016,47(9): 1151-1157.
- [14] 覃梦瑶,阮文懿,翟苑好,等. 三伏贴中芥子碱及细辛挥发油促进 HaCaT 细胞摄取延胡索乙素的作用及其机制研究 [J]. 中草药,2018,49(2): 400-405.
- [15] An L N, Dang Y J, Hu C H, et al. Physicochemical properties and gastric mucosa irritation of cantharidin-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(3): 224-229.
- [16] Yang L J, Xia S, Ma S X, et al. Host-guest system of hesperetin and β -cyclodextrin or its derivatives: Preparation, characterization, inclusion mode, solubilization and stability [J]. *Mater Sci Eng C*, 2016, 59(3): 1016-1024.
- [17] Yang L J, Wang S H, Zhou S Y, et al. Supramolecular system of podophyllotoxin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Characterization, inclusion mode, docking calculation, solubilization, stability and cytotoxic activity [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 76: 1136-1145.
- [18] Ma S X, Chen W, Yang X D, et al. Alpinetin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: Preparation, characterization, inclusion mode, solubilization and stability [J]. *J Pharm Biomed*, 2012, 67/68(4): 193-200.
- [19] Zhang J Q, Wu D, Jiang K M, et al. Preparation, spectroscopy and molecular modelling studies of the inclusion complex of cordycepin with cyclodextrins [J]. *Carbohydr Res*, 2015, 406: 55-64.
- [20] Yang X M, Zhao Y L, Chen Y J, et al. Host-guest inclusion system of mangiferin with β -cyclodextrin and its derivatives [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013, 33(4): 2386-2391.
- [21] 邓晋丽,马莉,韩峰,等. 兔兔鼻腔给药冰片-羟丙基- β -环糊精包合物的药动学研究 [J]. 现代药物与临床,2015,30(3): 258-261.
- [22] 郭波红,廖灿城,吴秀君,等. 芒柄花素 2-羟丙基- β -环糊精包合物的制备及其包合行为探讨 [J]. 中草药,2017,48(14): 2877-2882.

- [23] 李学林, 陈鹏举, 桂新景, 等. 电子舌在羟丙基- β -环糊精抑苦规律研究中的应用 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4235-4244.
- [24] 王弋然, 徐芳. 复方胃安胶囊中延胡索乙素含量测定 [J]. 时珍国医国药, 1999, 10(2): 92-92.
- [25] 陈平, 谭晓梅, 王炜, 等. 复方延胡索片质量标准研究 [J]. 贵阳中医学院学报, 2007, 29(3): 70-71.
- [26] 陈军, 李磊, 祁艳, 等. 羟丙基- β -环糊精对马钱子碱贴膏剂药理学性质的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2168-2172.
- [27] 许学健, 胡培华. 延胡索乙素注射液制法的改进 [J]. 中国药学杂志, 1979, 14(7): 307-308.
- [28] Renny J S, Tomasevich L L, Tallmadge E H, *et al.* Method of continuous variations: Applications of Job plots to the study of molecular associations in organometallic chemistry [J]. *Angew Chem*, 2013, 52(46): 11998-12013.
- [29] Caso J V, Russo L, Palmieri M, *et al.* Investigating the inclusion properties of aromatic amino acids complexing beta-cyclodextrins in model peptides [J]. *Amino Acids*, 2015, 47(10): 2215-2227.
- [30] Seridi L, Boufelfel A. Molecular modeling study of lamotrigine/ β -cyclodextrin inclusion complex [J]. *J Mol Liq*, 2011, 158(2): 151-158.
- [31] Morris G M, Huey R, Lindstrom W, *et al.* Autodock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility [J]. *J Comput Chem*, 2009, 30(16): 2785-2791.
- [32] Zhang C L, Liu J C, Yang W B, *et al.* Experimental and molecular docking investigations on the inclusion mechanism of the complex of phloridzin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin [J]. *Food Chem*, 2017, 215: 124-128.
- [33] Yang L J, Chang Q, Zhou S Y, *et al.* Host-guest interaction between brazilin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Preparation, inclusion mode, molecular modelling and characterization [J]. *Dyes Pigment*, 2018, 150: 193-201.
- [34] Morris G M, Huey R, Lindstrom W, *et al.* Autodock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility [J]. *J Comput Chem*, 2009, 30(16): 2785-2791.
- [35] Montassier P, Duchêne D, Poelman M C. Inclusion complexes of tretinoin with cyclodextrins [J]. *Int J Pharm*, 1997, 153(2): 199-209.
- [36] Jullian C, Moralesmontecinos J, Zapatorres G, *et al.* Characterization, phase-solubility, and molecular modeling of inclusion complex of 5-nitroindazole derivative with cyclodextrins [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(9): 5078-5084.
- [37] de Melo N F, Grillo R, Rosa A H, *et al.* Interaction between nitroheterocyclic compounds with beta-cyclodextrins: Phase solubility and HPLC studies [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 47(5): 865-869.
- [38] Pérezcruz F, Jullian C, Rodriguez J, *et al.* Molecular encapsulation of 5-nitroindazole derivatives in 2,6-dimethyl-beta-cyclodextrin: Electrochemical and spectroscopic studies [J]. *Bioorganic Med Chem*, 2009, 17(13): 4604-4611.
- [39] 恽菲, 徐晓琰, 狄留庆, 等. 蛇床子素不同环糊精包合物的制备及其生物利用度比较研究 [J]. 中草药, 2014, 45(3): 341-348.