

## • 药剂与工艺 •

长春胺与羟丙基- $\beta$ -环糊精包合物的制备、表征及理论研究

杨云汉<sup>1</sup>, 赵雪秋<sup>1</sup>, 杜瑶<sup>1</sup>, 杨俊丽<sup>1</sup>, 陈文<sup>2</sup>, 李燕华<sup>3</sup>, 杨丽娟<sup>1\*</sup>, 钊永明<sup>1\*</sup>

1. 云南民族大学化学与环境学院 生物基材料绿色制备技术国家地方联合工程中心, 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
3. 昆明贵金属研究所, 云南 昆明 650100

**摘要:** 目的 制备长春胺(VIN)与羟丙基- $\beta$ -环糊精(HP- $\beta$ -CD)的包合物(VIN/HP- $\beta$ -CD), 并对包合物进行表征和性能测定, 采用量化计算与分子模拟方法从理论角度研究其包含机制。方法 通过饱和溶液法制备 VIN/HP- $\beta$ -CD; 以包合物的载药量为指标, 选用正交试验筛选 VIN/HP- $\beta$ -CD 包合物制备处方与工艺; 运用紫外-可见光谱滴定法研究 VIN 与 HP- $\beta$ -CD 之间的包含行为, 用 Job 曲线法确定其包含比。采用扫描电镜(SEM)、X 射线粉末衍射(XRD)、红外吸收光谱(IR)、热分析技术(TG、DSC)和核磁共振(<sup>1</sup>H-、2D-NMR)对 VIN/HP- $\beta$ -CD 包合物进行表征。测定 VIN/HP- $\beta$ -CD 包合物的水溶性, 并在模拟人体胃液和肠液环境下测试包合物稳定性, 进一步采用理论计算研究 VIN/HP- $\beta$ -CD 超分子体系的形成机制。结果 采用饱和溶液法制备该包合物的最优条件为投料比 VIN 与 HP- $\beta$ -CD 1:1, 包含温度 40 °C, 包含时间为 7 h, 甲醇与水的体积比为 1:6 作为溶剂。包合物的包含比为 1:1, VIN 与 HP- $\beta$ -CD 形成包合物后, 其水溶性从原来的 0.04 mg/mL 提高到了 16.5 mg/mL, VIN 的热分解温度从 240.5 °C 提高到了 306.1 °C。<sup>1</sup>H-NMR 与 NOESY 谱表明包合物是 VIN 的 a 环从 HP- $\beta$ -CD 的大口端进入而形成的, 量化计算与分子对接表明最优包含模式与核磁共振研究结果一致; 分子动力学模拟研究表明, 在水环境中 VIN 能深入 HP- $\beta$ -CD 的疏水空腔, 主-客体之间的相互作用加强, 空间尺寸匹配较好。结论 VIN 与 HP- $\beta$ -CD 形成包合物后, 水溶性和热稳定性得到显著提高, 疏水作用、氢键作用和范德华力为包合物形成的主要驱动力。

**关键词:** 长春胺; 羟丙基- $\beta$ -环糊精; 包合物; 性能研究; 量化计算; 分子对接; 分子动力学

**中图分类号:** R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)02-0352-12

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.02.013

## Preparation, spectroscopy and molecular modelling studies of inclusion complex of vincamine with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin

YANG Yun-han<sup>1</sup>, ZHAO Xue-qiu<sup>1</sup>, DU Yao<sup>1</sup>, YANG Jun-li<sup>1</sup>, CHEN Wen<sup>2</sup>, LI Yan-hua<sup>3</sup>, YANG Li-juan<sup>1</sup>, CHUAN Yong-ming<sup>1</sup>

1. National and Local Joint Engineering Research Center for Green Preparation Technology of Biobased Materials, School of Chemistry & Environment, Yunnan Minzu University, Kunming 650500, China
2. Key Laboratory of Medicinal Chemistry for Natural Resource, Ministry of Education, Yunnan University, Kunming 650091, China
3. Kunming Institute of Precious Metals, Kunming 650100, China

**Abstract: Objective** The inclusion complex of vincamine (VIN) and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) was prepared and characterized. Molecular simulation method was used to study the formation mechanism of inclusion complex. **Methods** The inclusion complex of VIN/HP- $\beta$ -CD was prepared by saturated solution. The preparation technology of VIN/HP- $\beta$ -CD inclusion

收稿日期: 2018-09-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21762051); 国家自然科学基金资助项目(21562048); 云南省高校科技创新团队支持计划资助; 云南民族大学研究生创新项目(2018YJXS245)

作者简介: 杨云汉(1994—), 男, 在读硕士, 研究方向为超分子化学。E-mail: yangyhchem@163.com

\*通信作者 杨丽娟(1971—), 女, 白族, 硕士生导师, 教授, 研究方向为超分子化学。Tel: (0871)65910017 E-mail: yanglijiang@sina.com  
钊永明(1983—), 男, 硕士生导师, 讲师, 研究方向为药物合成。E-mail: chuan5211017@126.com

complex was optimized by orthogonal design, and taking the drug-loading of the inclusion compound as the index. The stability constant of inclusion complex between VIN and HP- $\beta$ -CD was studied by UV-Vis spectrometry titration, and the inclusion ratio was determined by Job plots method. The VIN/HP- $\beta$ -CD inclusion complex was characterized by scanning electron microscope (SEM), X-ray powder diffractometry (XRD), infrared spectroscopy (IR), thermal analysis techniques (TG and DSC), and nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$ ,  $2\text{D}$  NMR). The water solubility of the VIN/HP- $\beta$ -CD inclusion complex was measured and the stability test was conducted in the simulated human gastric juice and intestinal fluid environment. Molecular docking and molecular dynamics were used to study the forming mechanism of supramolecular system of VIN/HP- $\beta$ -CD. **Results** Using saturated solution method, the optimum conditions of inclusion were: 1 : 1 for molar ratio of VIN and HP- $\beta$ -CD, 40 °C for inclusion temperature, 7 h for inclusion time and volume ratio of methanol to water (1 : 6) as solvent; Job curve and UV-vis spectroscopy showed that inclusion ratio of host-guest inclusion complexes was 1 : 1; After VIN formed inclusion complexes with HP- $\beta$ -CD, its solubility increased from 0.04 mg/mL to 16.5 mg/mL, and the thermal decomposition temperature of VIN increased from 240.5 °C to 306.1 °C.  $^1\text{H}$ -NMR and NOESY spectra indicated that the inclusion complex was formed by the a-ring of VIN entering from the large end of HP- $\beta$ -CD. Quantum chemical calculation and molecular docking indicated that the optimal inclusion mode was consistent with the results of NMR studies. Molecular dynamics studies showed that VIN can penetrate into the hydrophobic cavity of HP- $\beta$ -CD in water environment, and the interaction between host and guest was strengthened. The space size of host-guest matched better. **Conclusion** The solubility and thermal stability were significantly improved after the formation of inclusion complex with VIN and HP- $\beta$ -CD. Hydrophobicity, hydrogen bonding, and van der Waals forces were the main driving forces for inclusion complex formation. **Key words:** vincamine; hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin; inclusion complex; performance study; quantum calculation; molecule docking; molecule dynamics

长春胺 (vincamine, VIN) 属于单萜吲哚生物碱中的白坚木碱类, 可由小蔓长春花和薄叶山橙分离得到<sup>[1-2]</sup>。长春胺具有降血糖、保护肝脏、抗肿瘤和预防心脑血管疾病等作用<sup>[3-6]</sup>。虽然目前 VIN 作为片剂、缓释胶囊被使用, 但因其复杂的化学结构和亲油性质, 导致其水溶性较低及口服生物利用度较差, 这极大地限制了其临床应用。环糊精作为药物载体被广泛使用, 它可以提高药物的水溶性与稳定性<sup>[7-14]</sup>。羟丙基- $\beta$ -环糊精 (HP- $\beta$ -CD) 是应用最广泛的环糊精衍生物之一<sup>[15-16]</sup>。此外, HP- $\beta$ -CD 也是美国 FDA 第 1 个批准可供注射的  $\beta$ -环糊精衍生物, 本课题组曾选用环糊精为药物载体, 构建了多种高水溶性、稳定性的天然药物超分子包合物<sup>[17-20]</sup>。本研究将制备 VIN 与 HP- $\beta$ -CD 的包合物 (VIN/HP- $\beta$ -CD), 并对包合物的制备工艺进行优化, 探讨包合物的包合模式、表征及性能, 并利用量化计算、分子对接和分子动力学模拟研究其包合机制, 为 VIN 作为临床药物的进一步应用提供化学研究基础。此外, 清晰的包合模式分析也将为该超分子药物的定量构效关系探讨提供理论参考。

## 1 仪器与材料

UV-8453 紫外-可见分光光谱仪, 安捷伦科技有限公司; 85-2 恒温磁力搅拌器, 江苏国华仪器有限公司; BSA224S-CW 分析天平, Sartorius 公司; FEI PHENO 扫描电子显微镜 (SEM), 日本电子株式会

社; TTR 18 KW 转靶 X-射线衍射仪, 日本理学公司; Nicolet IS10 红外光谱仪, 美国 Thermo 科技有限公司; STA449F3 热分析仪, 德国耐驰公司; Bruker Avance 400 核磁共振仪, 瑞士布鲁克公司。

VIN ( $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $M_r=354.44$ , 质量分数 > 98%) 购于陕西宝鸡晨光生物有限公司; HP- $\beta$ -CD ( $M_r=1\ 380$ ) 购于 ABCR GmbH & Co. KG 公司, 未经纯化直接使用; 其余试剂均为普通市售分析纯试剂; 所有实验用水均为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 包合物的制备工艺筛选与优化

**2.1.1 测定波长的选择** 用无水甲醇配制适量的 VIN、HP- $\beta$ -CD 溶液, 将无水甲醇作为空白对照, 采用紫外-可见分光光谱仪在波长 200~1 000 nm 对 2 种溶液进行扫描, 结果在 281 nm 处 VIN 有最大吸收, 而 HP- $\beta$ -CD 在该波长处无吸收, 因此确定 VIN 的测定波长为 281 nm。

**2.1.2 标准曲线的绘制** 用无水甲醇分别配制浓度为 0.038、0.045、0.051、0.058、0.064、0.070、0.077 mmol/L 的 VIN 标准溶液, 并在最大吸收波长 281 nm 处测定相应吸光度 ( $A$ )。然后取 VIN 溶液的浓度 ( $C$ ) 为横坐标,  $A$  为纵坐标, 绘制 VIN 的标准曲线, 标准曲线方程为  $A=9.179 C-0.024\ 22$ ,  $r=0.999\ 2$ 。

**2.1.3 载药量的测定** 准确称取一定量的 VIN/HP-

β-CD 包合物, 加入定量的超纯水溶解后在 281 nm 处测定其 A 值<sup>[21]</sup>, 通过标准曲线方程得到包合物中 VIN 的含量, 再计算载药量(载药量=包合物中 VIN 的质量/包合物的质量)。

**2.1.4 正交试验设计** 采用饱和溶液法制备 VIN/HP-β-CD 包合物。分别精密称取不同物质的量比的 HP-β-CD 与 VIN, 用不同体积比的无水甲醇与水作为溶剂将 HP-β-CD 溶解, 采用 6 mL 甲醇将 VIN 溶解加入至 HP-β-CD 的溶液中, 并在不同的温度下搅拌相应的时间, 包合结束后除去剩余的 VIN 与 HP-β-CD, 并除去水和甲醇, 真空干燥即得包合物。

正交试验以载药量为评价指标, 选择 VIN 与 HP-β-CD 的物质的量比 (A)、包合温度 (B)、包合时间 (C) 和甲醇与水的体积比 (D) 为因素, 每个因素 3 个水平, 选用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 设计正交试验。正交结果的直观分析见表 1, 方差分析见表 2。

从表 1 中可看出 4 个因素对包合物载药量的影响为 C>A>B>D, 即包合时间>VIN 与 HP-β-CD 的物质的量比>包合温度>甲醇与水的体积比。A

表 1 正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of orthogonal test

实验号	A	B/°C	C/h	D	载药量/%
1	1:1(1)	30(1)	5(1)	1:4(1)	0.35
2	1:1(1)	40(2)	7(2)	1:6(2)	0.63
3	1:1(1)	50(3)	9(3)	1:8(3)	0.36
4	1:2(2)	30(1)	7(2)	1:8(3)	0.46
5	1:2(2)	40(2)	9(3)	1:4(1)	0.33
6	1:2(2)	50(3)	5(1)	1:6(2)	0.37
7	2:1(3)	30(1)	9(3)	1:6(2)	0.36
8	2:1(3)	40(2)	5(1)	1:8(3)	0.54
9	2:1(3)	50(3)	7(2)	1:4(1)	0.61
K <sub>1</sub>	1.34	1.17	1.26	1.29	
K <sub>2</sub>	1.16	1.50	1.70	1.36	
K <sub>3</sub>	1.51	1.34	1.05	1.36	
R	0.35	0.33	0.65	0.07	

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.020 422 22	2	18.755 1	P<0.01
B	0.018 155 56	2	16.673 5	
C	0.073 355 56	2	67.367 3	P<0.01
D	0.001 088 89	2	1.000 0	

F<sub>0.05</sub>(2, 2)=19.00

因素和 C 因素在不同水平间存在显著性差异 (P<0.01), 为重要的影响因素, B 因素和 D 因素不存在显著性差异, 为次要影响因素。综合考虑包合物的载药量与成本因素, 最优制备工艺为 A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, 即以 VIN、HP-β-CD 投料物质的量比为 1:1, 包合温度为 40 °C, 包合时间为 7 h, 甲醇与水的体积比为 1:6。

**2.1.5 工艺验证实验** 为了对优化工艺进行验证, 平行制备 3 批 VIN/HP-β-CD 的包合物, 然后根据“2.1.3”项方法测定载药量, 结果显示 VIN/HP-β-CD 载药量为 (0.67±0.04) % (n=3)。

**2.2 包合物的表征**

**2.2.1 VIN/HP-β-CD 包合物与物理混合物的制备** 采用“2.1.4”项中的优化方法制备 VIN/HP-β-CD 包合物, 并按照相同的物质的量比分别称取 VIN、HP-β-CD 使其充分混合均匀, 分别置于真空干燥箱中干燥 12 h 后即得 VIN/HP-β-CD 包合物与物理混合物。

**2.2.2 热分析 (DSC 和 TG)** 分别准确称取样品 VIN、VIN/HP-β-CD 包合物和 VIN/HP-β-CD 物理混合物 13.8、5.1、4.0 mg。在 N<sub>2</sub> 流 50 mL/min 下, 设置升温速率为 12 °C/min, 升温范围 20~1 000 °C。从热重分析 (TG) 系统可知 (如图 1-B), VIN 在 240.5 °C 左右分解, HP-β-CD 在 298.0 °C 左右分解。包合物在 306.1 °C 左右分解。也就是说, VIN 在形成配位包合物后, 分解温度得到提高。从图 1-A 可知, VIN 的示差扫描量热法 (DSC) 谱图曲线在 244.1 °C 附近存在很尖的吸热峰, HP-β-CD 在 67.0 °C 附近出现吸热峰。从图 1-A 还可看出包合物形成后使原本 VIN 在 244.1 °C 的吸热峰完全消失, 并出现了 274.4 °C 的吸热峰和 354.8 °C 的放热峰。

上述分析结果进一步验证了 VIN 与 HP-β-CD 形成包合物后使分解温度升高、热稳定性得到了改善。

**2.2.3 粉末衍射 (XRD) 分析** 分别称取适量样品 VIN、VIN/HP-β-CD 包合物和 VIN/HP-β-CD 物理混合物, 设置实验条件为 Cu Kα (K=0.154 60 nm), 40 mA, 40 kV, 测试温度为室温, 扫描速率 6°/min, 步长 0.02°, 扫描范围从 3°~50°。从图 2-a 可以看出 VIN 在具有良好的晶型结构: 在 7.98°、10.47°、12.52°、14.05°、19.69°处有较强的衍射峰。图 2-b 为 HP-β-CD 无定形结构, 在 2θ: 15.00°~35.00°出现宽大的特征峰, 从图 2-c 显示了主-客物理混合物的衍射峰基本上是 VIN 与 HP-β-CD 的简单叠加, VIN 较强的衍射峰与 HP-β-CD 较宽的衍射峰都清晰

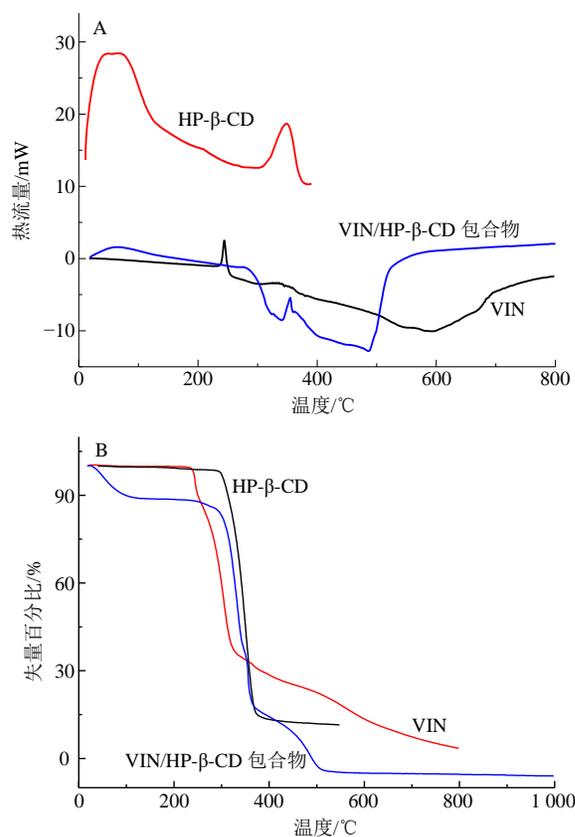


图 1 DSC (A) 与 TG (B) 曲线  
Fig. 1 DSC (A) and TG (B) analysis curve

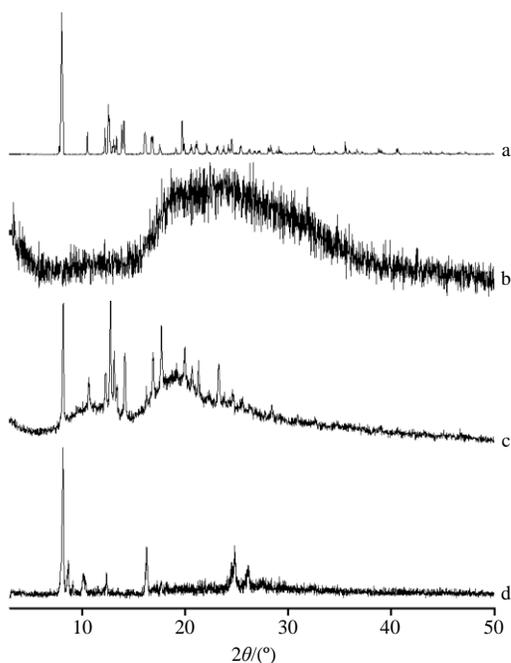


图 2 VIN (a)、HP-β-CD (b)、VIN/HP-β-CD 物理混合物 (c) 和 VIN/HP-β-CD 包合物 (d) 的 X 射线粉末衍射 (XRD)  
Fig. 2 X-ray diffraction (XRD) patterns of VIN (a), HP-β-CD (b), VIN/HP-β-CD physical mixture (c), and VIN/HP-β-CD inclusion complex (d)

可见。VIN 与 HP-β-CD 形成包合后的衍射峰如图 2-d 所示，VIN 在  $2\theta$   $10^\circ\sim 30^\circ$  的大部分晶体衍射峰都已基本消失，此外，HP-β-CD 较宽的衍射峰也已消失，VIN 与 HP-β-CD 形成包合物后，其结构在某种程度上重新排列，比起单一的 VIN 具有更显著的不定形结构，说明了 VIN 与 HP-β-CD 之间生成了配位包合物。

**2.2.4 红外吸收光谱 (FTIR) 分析** 实验前将 VIN、VIN/HP-β-CD 包合物和 VIN/HP-β-CD 物理混合物在红外灯下干燥 3 h，采用压片法将待测样品和 KBr 混合并研磨成粉末，然后在制片模具中压成薄片，再将其放入样品槽测定红外吸收光谱。如图 3 所示，在 VIN 红外谱图 (图 3-a) 中  $1\ 748\ \text{cm}^{-1}$  和  $742.63\ \text{cm}^{-1}$  处存在 2 个最强的吸收峰，分别是 C=O 和 C-O-C 的伸缩振动；在  $2\ 966.76\ \text{cm}^{-1}$  左右处是 C-N 的伸缩振动。 $3\ 790\sim 3\ 020\ \text{cm}^{-1}$  是 HP-β-CD (图 3-b) 的 O-H 的伸缩振动峰，且 -CH 和 -CH<sub>2</sub> 中 C-H 伸缩振动吸收带位于  $3\ 000\sim 2\ 800\ \text{cm}^{-1}$ ；物理混合物的红外图谱是主客体物质的简单重叠，而包合物的红外图谱 VIN 的特征峰有明显的偏移，羰基、醚键特征峰消失。VIN 与 HP-β-CD 包合前后红外吸收光谱的变化，说明了客体药物与环糊精主体形成了包合物。

**2.2.5 SEM 分析** 硅晶 SEM 是物质表面结构定性分析最常用的方法之一，从图 4 中可见，VIN 呈现八面体结构，HP-β-CD 是带有一些微孔的球状晶体，主-客体物理混合物则是两者的简单堆积。包合物的

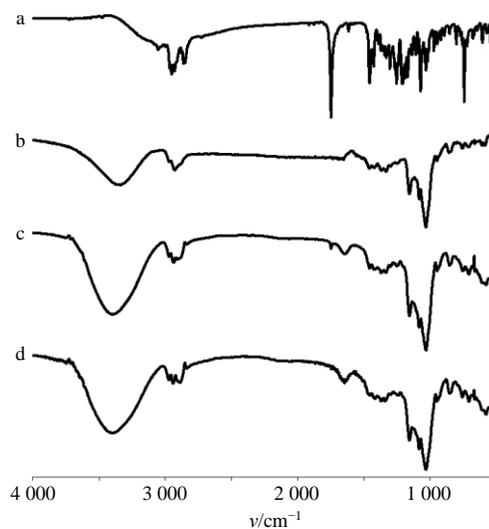


图 3 VIN (a)、HP-β-CD (b)、VIN/HP-β-CD 物理混合物 (c) 和 VIN/HP-β-CD 包合物 (d) 的 FTIR  
Fig. 3 FTIR of VIN (a), HP-β-CD (b), VIN/HP-β-CD physical mixture (c), and VIN/HP-β-CD inclusion complex (d)

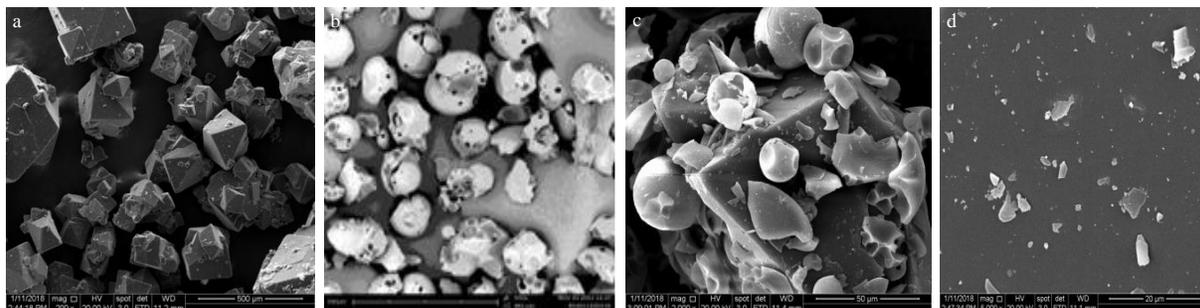


图 4 VIN (a)、HP-β-CD (b)、VIN/HP-β-CD 物理混合物 (c) 和 VIN/HP-β-CD 包合物 (d) 的 SEM 图

Fig. 4 SEM micrographs of VIN (a), HP-β-CD (b), VIN/HP-β-CD physical mixture (c), and VIN/HP-β-CD inclusion complex (d)

晶形结构则不同于主体、客体以及物理混合物，它呈现的是体积增大的、表面不光滑的形态，其结构发生了明显的变化。这说明 VIN/HP-β-CD 包合物制备成功，主-客体之间发生了相互作用。

**2.2.6 包合物核磁共振 (<sup>1</sup>H-、2D-NMR) 测定** 为研究 VIN/HP-β-CD 包合物的包合模式，对包合物进行核磁表征。由于 VIN 难溶于水，在氘代水 (D<sub>2</sub>O) 中检测不到其质子信号，而经 HP-β-CD 包合后，包合物的 <sup>1</sup>H-NMR 中出现了清晰的 VIN 质子信号。包合前、后 HP-β-CD 中质子的化学位移变化如图 5 所示，相关质子变化见表 3，H-3 和 H-Me 的化学位移变化分别为 0.12 和 0.13，而 H-5 变化了 0.10。VIN 与 HP-β-CD 之间配位包合行为的 NOESY 谱见图 6，VIN 的 H-4, 5 与 HP-β-CD 的 H-3, 5, 6 存在 NOE 相关，VIN 的 H-13, 17 与 HP-β-CD 的 H-5, 6 存在 NOE 相关，VIN 与 HP-β-CD 之间的相关分析如图 7 所示。

**2.3 光谱测定**

**2.3.1 Job 曲线的测定** 采用 Job 曲线法<sup>[18]</sup>测定 VIN/HP-β-CD 的包合计量比。采用 pH 10.5 的无水碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液配制系列浓度梯度的 VIN 与 HP-β-CD 的混合溶液，维持体系总浓度为 80 μmol/L，然后使 VIN 与 HP-β-CD 的物质的量比在

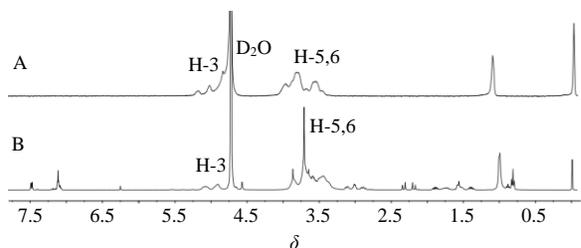


图 5 HP-β-CD (A) 与 VIN/HP-β-CD 包合物 (B) 的核磁共振氢谱 (D<sub>2</sub>O, 25 °C)

Fig. 5 <sup>1</sup>H-NMR spectra of HP-β-CD (A) and VIN/HP-β-CD complex (B) (D<sub>2</sub>O, 25 °C)

表 3 HP-β-CD 和 VIN/HP-β-CD 包合物的化学位移  
Table 3 Chemical shifts (δ) of HP-β-CD and VIN/HP-β-CD complex

氢位	峰形	δ 值	
		HP-β-CD	VIN/HP-β-CD
H-1	d	5.04	4.92
H-2	dd	3.57	3.52
H-3	dd	4.00	3.88
H-4	dd	3.48	3.45
H-5	m	3.82	3.72
H-6	dd	3.82	3.72
H-Me	s	1.12	1.00

0~1 内变化<sup>[22]</sup>，并在最大吸收波长 281 nm 处测定 A 值。然后根据两组溶液的吸光度差值 (ΔA) 与客体摩尔分数得到如图 8 所示的 Job 曲线。观察曲线明显发现，当摩尔分数为 0.5 时，两组溶液的 ΔA 达到最大。由此，可以得出 VIN/HP-β-CD 包合物的包合比为 1 : 1。

**2.3.2 紫外-可见光谱滴定实验** 使 VIN 的浓度保持在 0.064 mmol/L，改变 HP-β-CD 的浓度在 0~4.00 mmol/L 变化 (HP-β-CD pH 值 3.0 和 10.5 均为 0.00、0.23、0.33、0.47、0.67、0.96、1.37、1.96、2.80、4.00 mmol/L) 使用缓冲溶液 (pH 值 3.0、10.5) 和水-甲醇 (4 : 1) 混合溶液定容。1 h 后开始测定紫外-可见吸收光谱，所有实验平行测定 3 次。紫外滴定处理结果见图 9 (A-1、B-1)，在所有实验过程中，溶液的 pH 值没有发生变化。假定与 HP-β-CD 的包结配位计量比为 1 : 1，根据文献方法<sup>[13]</sup>计算得到的不同 pH 值下 VIN 与 HP-β-CD 包合物的稳定常数 (K<sub>s</sub>) 和吉布斯自由能变化 (-ΔG°) 如表 4 所示。图 9 (A-2、B-2) 显示了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 VIN 与 HP-β-CD 按照 1 : 1 进行包合。

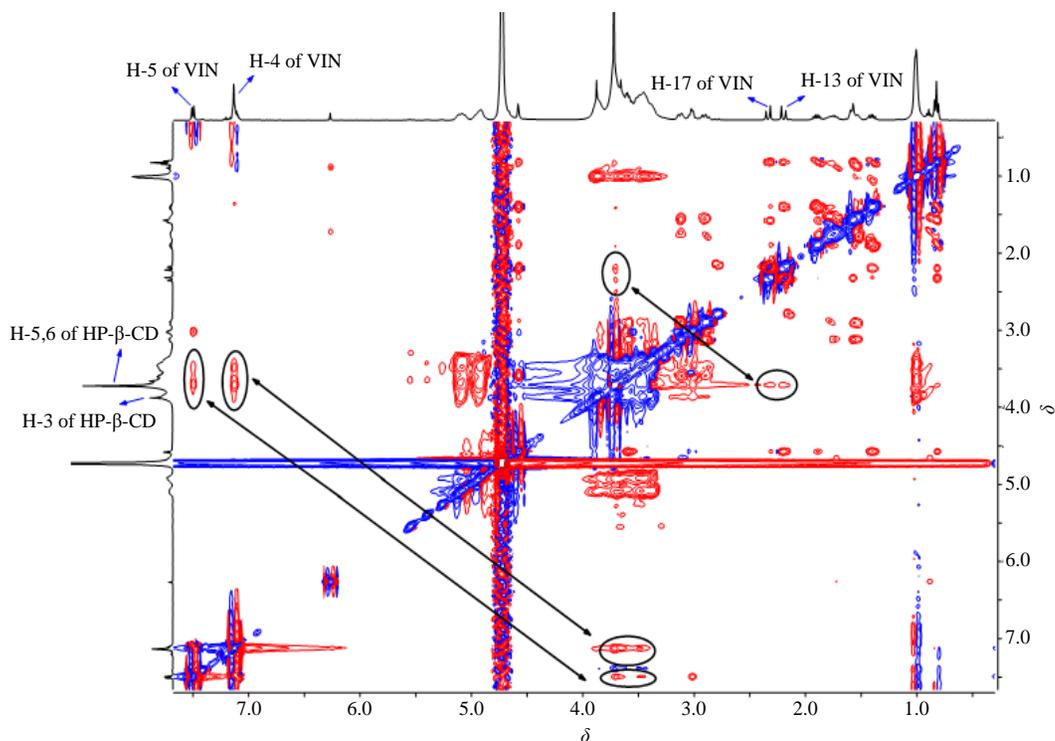


图 6 VIN/HP-β-CD 包合物的 NOESY 谱 (D<sub>2</sub>O)  
Fig. 6 NOESY spectrum of VIN/HP-β-CD complex (D<sub>2</sub>O)

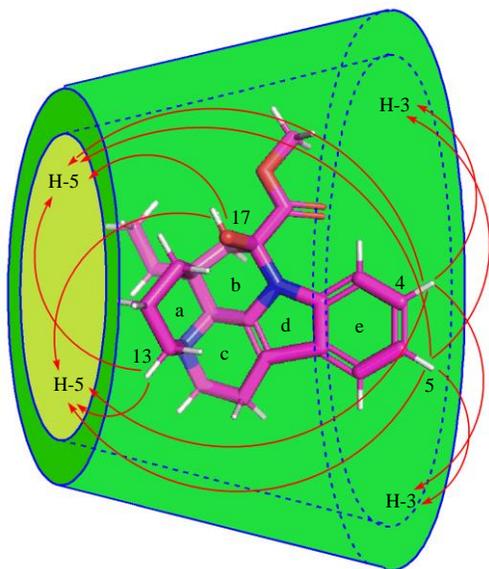


图 7 VIN/HP-β-CD 包合物的可能包含模式与关键的 NOESY 相关

Fig. 7 Possible inclusion mode and key NOESY correlations of VIN/HP-β-CD complex

## 2.4 包合物的性能研究

**2.4.1 VIN/HP-β-CD 包合物的溶解度实验** 通过制备饱和溶液的方法测定 VIN/HP-β-CD 包合物在水中的溶解度<sup>[23]</sup>。将过量的 VIN/HP-β-CD 包合物加入到 2 mL 水 (pH 约为 7.0) 中, N<sub>2</sub> 氛下, 混合

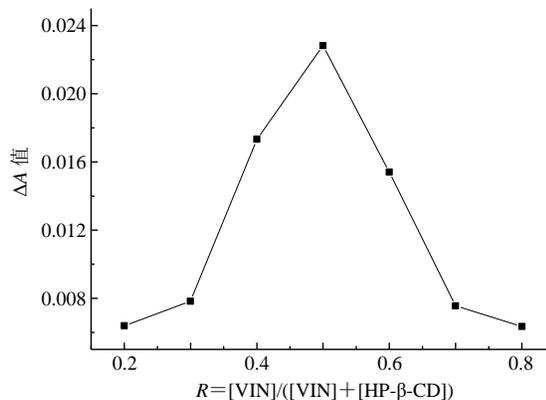
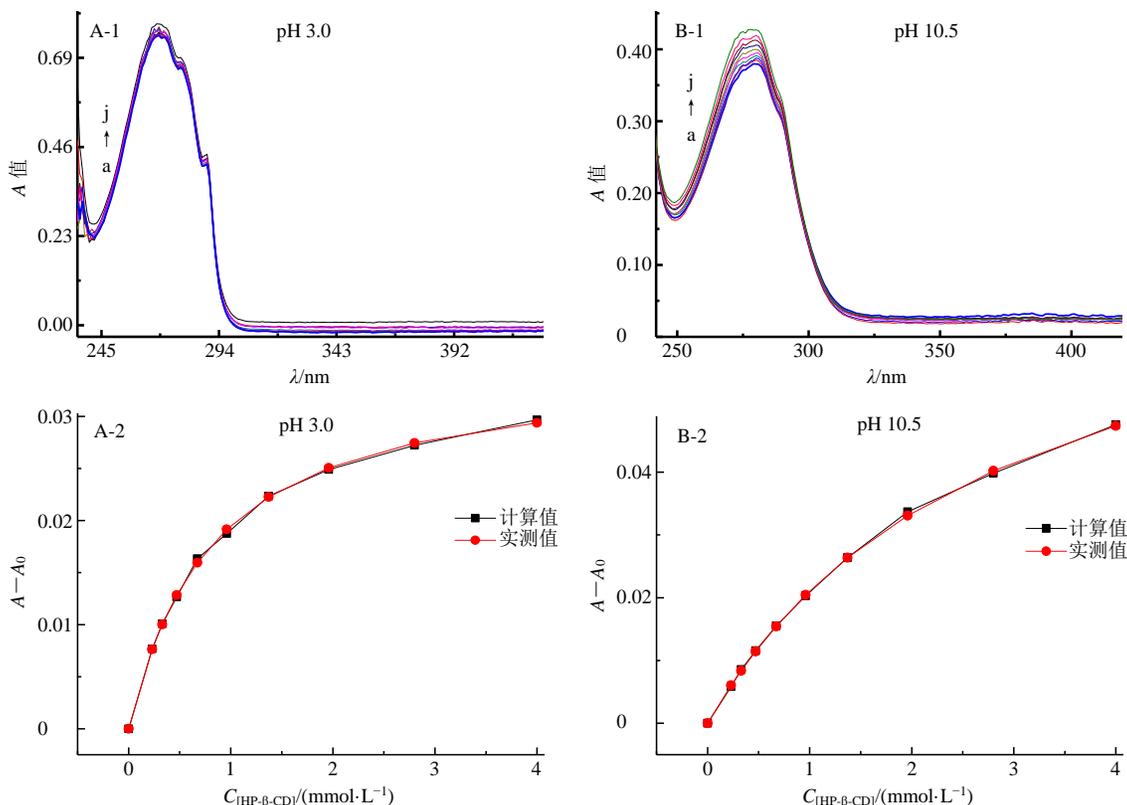


图 8 VIN/HP-β-CD 包合物在 pH 10.5 中的 Job 曲线  
Fig. 8 Job plot for VIN/HP-β-CD complex at pH 10.5

物于 (20±2) °C 温度下避光搅拌 1 h。然后用醋酸纤维素膜 (0.45 μm) 滤过; 滤液经减压蒸馏后得到白色固体。用水溶解后, 在 281 nm 处测定溶液的 A 值, 根据 VIN 标准曲线计算包合物中 VIN 的含量。与 VIN 的溶解度 (0.04 mg/mL, pH 7.4) 相比较, VIN 与 HP-β-CD 形成包合物后, 水溶性明显地提高到了 16.5 mg/mL (以 VIN 计)。

**2.4.2 VIN/HP-β-CD 包合物的稳定性实验** 准确移取一定体积的 VIN 溶液于 2 个 25 mL 棕色量瓶中, 加入适量 HP-β-CD, 并用 pH 1.5 和 pH 7.6 的缓冲溶液和无水甲醇的混合溶液定容。静置 1 h 至



a~j: HP- $\beta$ -CD 0.00、0.23、0.33、0.47、0.67、0.96、1.37、1.96、2.80、4.00  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 9 VIN 在不同的 pH 缓冲溶液中加入 HP- $\beta$ -CD 的紫外-可见光谱滴定图 (A-1、B-1) 和包合物热力学变化的非线性最小二乘拟合曲线 (A-2、B-2)

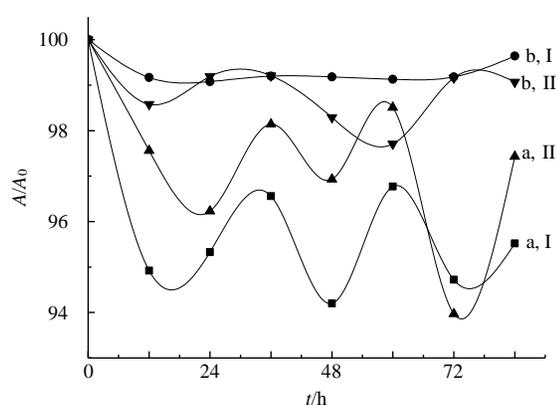
Fig. 9 UV-visible spectroscopy titration diagram (A-1, B-1) of adding HP- $\beta$ -CD to VIN and nonlinear least-squares analysis to calculate the thermodynamic change of complex (A-2, B-2) in different pH buffer solutions

表 4 VIN 与 HP- $\beta$ -CD 在 pH 3.0 和 pH 10.5 中的  $K_s$  和  $-\Delta G^\circ$   
Table 4  $K_s$  and  $-\Delta G^\circ$  of VIN and HP- $\beta$ -CD at pH 3.0 and pH 10.5

pH 值	缓冲体系	$K_s/$ ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	$\lg K_s$	$-\Delta G^\circ/$ ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
3.0	磷酸氢二钠-柠檬酸	1 326	3.122	17.823
10.5	碳酸氢钠-无水碳酸钠	364	2.561	14.618

溶液平衡，用超级恒温水浴锅使测量温度保持在 37  $^\circ\text{C}$  左右，并用 VIN 原药液作为对照，固定波长为 281 nm，对 VIN 的 A 值进行跟踪测量，每隔 (12 $\pm$ 2) h，所有实验平行测定 3 次。

在模拟生物体环境的条件下，VIN 及其包合物的 A 值随时间的变化关系见图 10，测量目的是为了考察 HP- $\beta$ -CD 作为一种药物载体对 VIN 的承载能力。当 pH 7.6 时，在 0~96 h 包合物的 A 值变化缓慢，而 VIN 的 A 值变化则较大，但自由态的 VIN 的 A 值忽高忽低，相反，VIN/HP- $\beta$ -CD 包合物的 A 值则几乎没有变化，但在 48~60 h，有轻微变动但



A 为每 (12 $\pm$ 2) h 内所测 A 值， $A_0$  为原始 A 值

A is the accretion measured at (12 $\pm$ 2) h  $A_0$  is the original light absorption

图 10 VIN (a) 和 VIN/HP- $\beta$ -CD 包合物 (b) 在 pH 7.6 (I) 和 pH 1.5 (II) 中的相对吸光度 ( $A/A_0$ ) 随时间变化的曲线  
Fig. 10 VIN (a) and VIN/HP- $\beta$ -CD inclusion complex (b) relative absorbance ( $A/A_0$ ) versus time curve at pH 7.6 (I) and pH 1.5 (II)

之后又趋于稳定平衡。实验结果显示，无论是在碱性还是在酸性条件下，VIN 被 HP- $\beta$ -CD 包合后，其

生物体环境的稳定性得到提高。

## 2.5 分子模拟

**2.5.1 量化计算** 运用量子化学计算研究 VIN/HP-β-CD 包合物的形成机制。HP-β-CD 与 VIN 的初始结构取自剑桥晶体数据库，并采用半经验 PM3 方法，在没有任何对称性条件约束下进行结构优化以获取几何平衡结构。经结构分析，VIN 的分子尺寸较大，无法穿越 HP-β-CD 的空腔，且 VIN 分子也无法从 HP-β-CD 的小口端进入，但与 HP-β-CD 的大口端空间匹配度较高。基于此条件，采用坐标放置法<sup>[24]</sup>构建两条包合物形成的可能路径（图 11）。使 C\*原子带动整个 VIN 分子从 Z 轴的正方向进入 HP-β-CD 的空腔，主-客体之间的距离由 0.8 nm 处逐渐向坐标原点移动，每步移动 0.05 nm。采用 PM3 方法对每一步所形成的主-客体包合物进行单点能计算以获取能量变化曲线。为了提高计算的准确性，将 2 条路径中能量最低的包合物结构进行 PM3 全优化。同时，将 VIN/HP-β-CD 包合物的结构分为 2 层：低层为 HP-β-CD 高层为 VIN，采用 ONIOM [HF/6-31G (d): PM3] 方法计算这 2 个稳定包合物的构型及能量，以便进一步确定最优包含模式。量化计算使用 Gaussian 09 软件包完成。

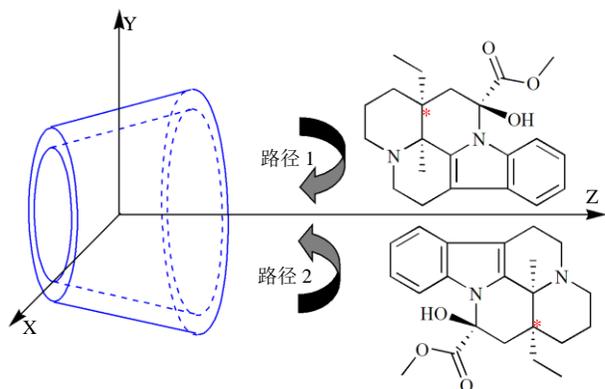


图 11 VIN 进入 HP-β-CD 空腔的 2 种可能取向  
Fig. 11 Two possible orientations of VIN in HP-β-CD

$$E_{\text{ONIOM}} = E_{(\text{high, model})} + E_{(\text{low, real})} - E_{(\text{low, model})}$$

$E_{\text{ONIOM}}$  为整个体系的总能量， $E_{(\text{high, model})}$  为高层体系的能量， $E_{(\text{low, real})}$  为低层真实体系的能量， $E_{(\text{low, model})}$  为低层模拟体系的能量

VIN 进入 HP-β-CD 空腔时的势能变化如图 12 所示。显然，对于 2 条路径来说，VIN 在 0.8~0.3 nm 时整个体系的能量不断降低，随后路径 1 的势能有小幅度的上升后降至全局最小值 n 点 (0.15 nm)，路径 2 在 0.2 nm (m 点) 处时的能量处于全局最小值。随着 VIN 的进一步进入 HP-β-CD 的空腔，由于原子间斥力与位阻效应的影响，路径 1 和路径 2 的能量急剧上升。为便于后续描述，将路径 1 和路径 2 中能量最低时所对应的结构分别称为包合物 n 与包合物 m。

经 PM3 和 ONIOM 方法计算得到的主-客及其包合物的相关热力学参数见表 5。VIN 和 HP-β-CD 的偶极矩分别为 1.80 Debye 和 12.56 Debye，当二者形成包合物后偶极矩发生了变化，表明包合物的形成使其具有了不同于主-客体新的结构性质。包合物 n 的结合能为 -55.59 kJ/mol，而包合物 m 的结合能为 -43.75 kJ/mol，越稳定的包合物具有越负的结合能，因此，包合物 n 要比包合物 m 更加稳定。二者

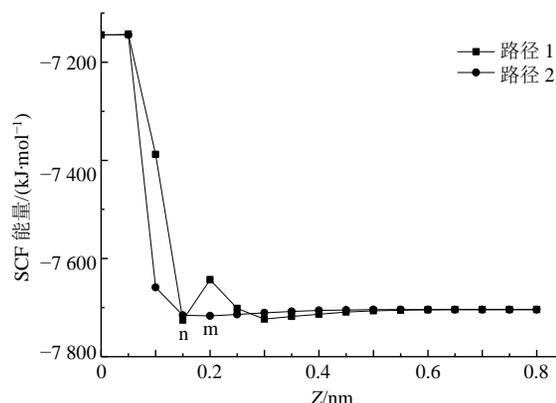


图 12 VIN 进入 HP-β-CD 空腔时的势能扫描图  
Fig. 12 Potential energy scan of VIN in HP-β-CD

表 5 VIN、HP-β-CD 及其包合物的相关热力学参数

Table 5 Thermodynamic parameters of VIN, HP-β-CD, and its inclusion complex

样品	偶极矩/ Debye	E/ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	ΔE/ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	H/ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	ΔH/ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	G/ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	ΔG/ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	S/ (J·mol <sup>-1</sup> ·K <sup>-1</sup> )	ΔS/ (J·mol <sup>-1</sup> ·K <sup>-1</sup> )	E <sub>ONIOM</sub> / (kJ·mol <sup>-1</sup> )
VIN	1.81	803.14	—	805.59	—	612.16	—	648.75	—	—
HP-β-CD	12.56	-2 360.53	—	-2 358.06	—	-3 126.40	—	2 577.03	—	—
包合物 n	14.10	-1 613.01	-55.59	-1 610.54	-58.07	-2 470.80	43.44	2 885.33	-340.46	-3 010 656.83
包合物 m	12.70	-1 601.17	-43.75	-1 598.69	-46.26	-2 473.44	40.80	2 933.93	-291.86	-3 010 639.56

$$\Delta E = E_{\text{complex}} - (E_{\text{host}} + E_{\text{guest}}) \quad \Delta H = H_{\text{complex}} - (H_{\text{host}} + H_{\text{guest}}) \quad \Delta G = G_{\text{complex}} - (G_{\text{host}} + G_{\text{guest}}) \quad \Delta S = S_{\text{complex}} - (S_{\text{host}} + S_{\text{guest}})$$

的焓变值均为负值,说明包合物的形成均为放热过程。包合物 k 具有更负的焓值,原因是其主-客体间具有更强的范德华相互作用力。包合物 n、m 的吉布斯自由能分别为 43.44、40.80 kJ/mol,显示了包合物的形成过程是非自发进行的。

此外,2 个包合物的熵值也为负值,说明了 VIN 与 HP- $\beta$ -CD 形成包合物的驱动力源于熵焓协同驱动。经分层计算得到包合物 n 与包合物 m 的  $E_{\text{ONIOM}}$  分别为 -3 010 656.83、-3 010 639.56 kJ/mol,同样证明包合物 n 比包合物 m 在热力学上更占优势。

氢键弱相互作用是包合物形成过程中的重要驱动力之一,根据 Gejji 等<sup>[25]</sup>和 Steiner 等<sup>[26]</sup>对氢键的

定义:C-H $\cdots$ O 型氢键的长度要小于 0.30 nm,O-H $\cdots$ O 型氢键的长度要在 0.240~0.250 nm。经 PM3 方法优化后,VIN 与 HP- $\beta$ -CD 之间形成的最优包合模式与氢键如图 13 所示,包合物 n 中有 5 条 C-H $\cdots$ O 型氢键,平均长度为 0.269 nm。包合物 m 中 4 条 C-H $\cdots$ O 型氢键,平均长度分为 0.279 nm。值得注意的是,在包合物 n 和包合物 m 中,并没有发现有 O-H $\cdots$ O 型氢键的形成。显然,从氢键形成的数量与结合能力来说,包合物 n 比包合物 m 要更稳定,且包合物 n 的主-客体结合模式与核磁共振研究结果一致。

## 2.5.2 分子对接 (AD) 与分子动力学 (MD) 结

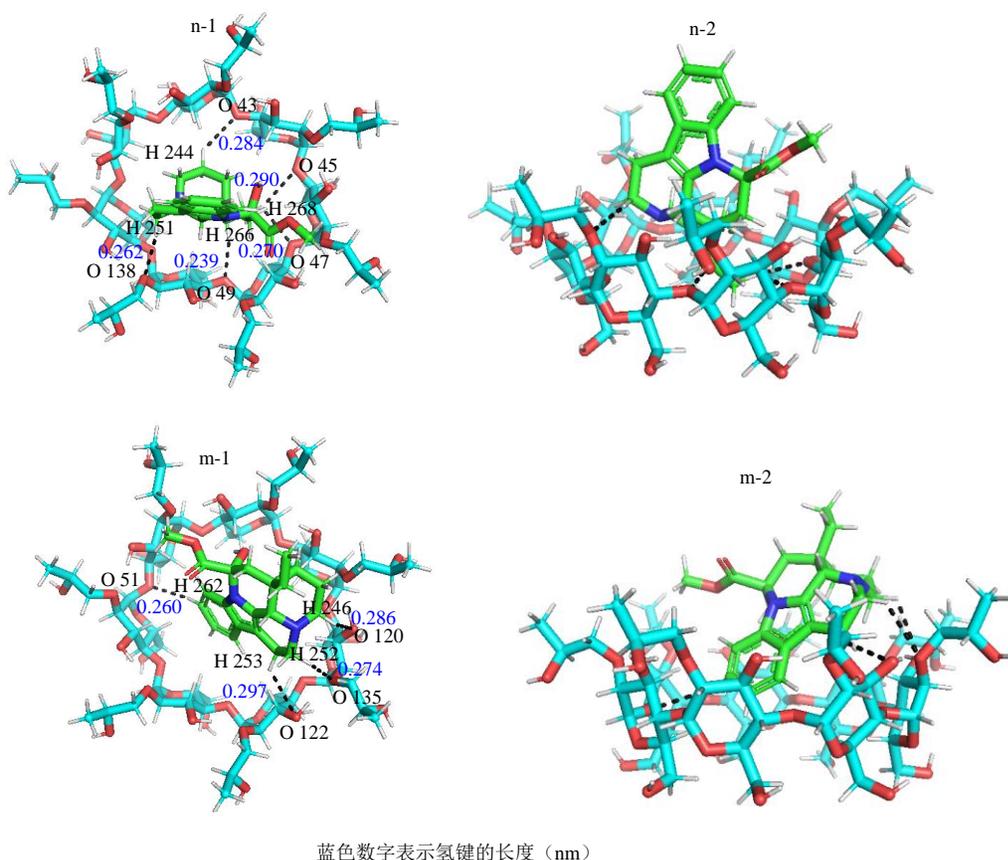


图 13 经 PM3 优化后包合物 n (n-1, n-2) 与包合物 m (m-1, m-2) 的结构及其形成的氢键

Fig. 13 Optimized structure and hydrogen bonds of complex n (n-1, n-2) and complex m (m-1, m-2) at PM3 level of theory

合 AD 与 MD 进一步研究主-客体络合模式。基于经验自由能函数和拉马克遗传算法,将 VIN 对接到 HP- $\beta$ -CD 的空腔中。对接时 HP- $\beta$ -CD 作为刚性受体分子,而药物作为配体分子允许柔性扭转。

设置 HP- $\beta$ -CD 格点盒子尺寸为 4.0 nm $\times$ 4.0 nm $\times$ 4.0 nm,格点间距默认为 0.375 nm,然后计算格点。最大评估数为  $2.5 \times 10^6$ ,选用拉马克遗传算

法执行 50 次构象搜索,完成对接后通过聚类分析探讨 VIN/HP- $\beta$ -CD 包合物的包合模式。MD 以 AD 得到的优势构象作为初始构型,利用 Amorphous Cell 模块构建 1 个 VIN/HP- $\beta$ -CD 包合物和 500 个水分子的溶剂盒子,设置密度为 1 g/cm<sup>3</sup>,选用 COMPASS 力场,然后利用 Forcite 模块 MD 模拟其中采用 NPT 系综,温度设为 300 K,步长为 1 fs,

每 20 ps 收集 1 次轨迹信息，模拟时长共为 10 ns。AD、MD 分别采用 Autodock 4.2<sup>[27]</sup>、Materials Studio 6.0 程序完成。

通过对 50 次构象搜索的结果进行聚类分析，得到了结合能最低的包含模式（图 14），最低的结合能代表最稳定的包含模式，即 VIN 的 a 环从 HP-β-CD 的宽口进入空腔，然后整个分子的 a、b、c 环被 HP-β-CD 包含，此时 VIN 分子停驻并斜靠在 HP-β-CD 的内壁，最终形成 VIN/HP-β-CD 配位包合物，VIN 分子上的羟基与 HP-β-CD 上羟丙基位上的氧原子形成 1 个氢键（0.197 4 nm），对接得出的最

优包含模式同核磁共振与量化计算的结果一致。

图 15 显示了 AD 的优势构象在水溶液中的包含模式变化（图 15 中水分子未显示），0 ns 时环糊精的羟丙基支链向外张开，VIN 斜靠在 HP-β-CD 内壁。随着模拟时间的延长，羟丙基支链收紧包裹住 VIN 分子，而原本斜靠在 HP-β-CD 内壁的 VIN 分子也逐渐直立，不溶于水的 VIN 分子也并未从 HP-β-CD 的空腔中脱离出来，而是选择深入其亲脂空腔当中，主-客体相互作用加强形成稳定的包合物，MD 模拟也显示了 VIN 分子与 HP-β-CD 亲脂空腔有较好的空间匹配性。

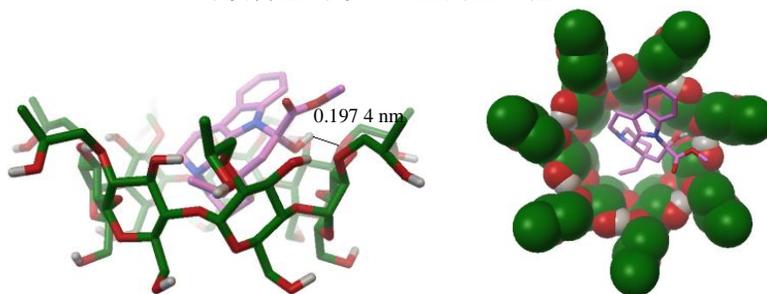


图 14 VIN 与 HP-β-CD 的分子对接包含模式

Fig. 14 Molecular docking conformation diagram of VIN/HP-β-CD

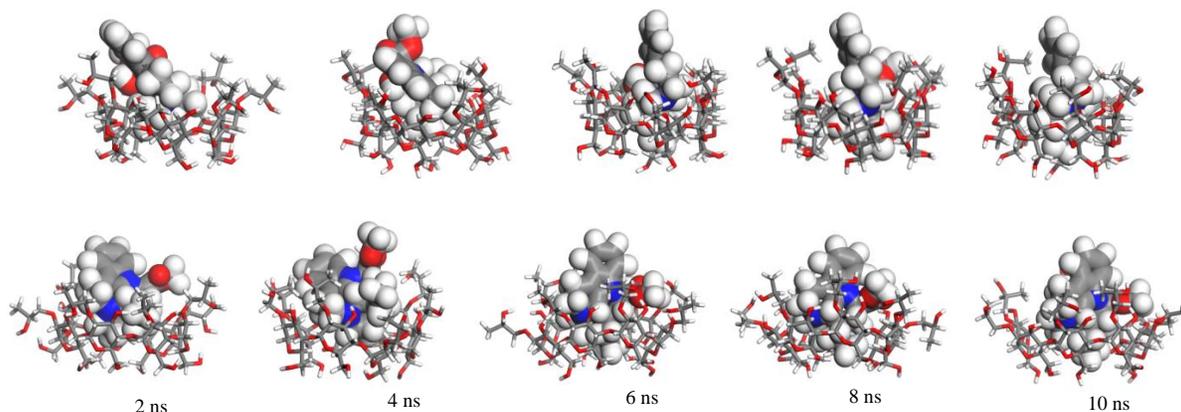


图 15 分子动力学模拟过程中截取的 VIN/HP-β-CD 包含物构型

Fig. 15 VIN/HP-β-CD inclusion intercepted configuration during molecular dynamics simulation

### 3 讨论

对 VIN 与 HP-β-CD 之间的包含行为进行了实验及理论研究。采用饱和溶液法制备了 VIN 与 HP-β-CD 的包合物，采用正交试验优化了包合物的制备工艺，最优制备工艺为 VIN 与 HP-β-CD 的投料比为 1 : 1，在 40 °C 条件下以甲醇-水（1 : 6）为溶剂搅拌 7 h。通过研究酸碱环境下的配位包含能力得出，VIN 与 HP-β-CD 在酸性环境下的配位包含常数远大于碱性环境，这说明了在酸性条件下 VIN/HP-β-CD 包合物更加稳定。

采用 XRD、IR、SEM 表征了 VIN 与 HP-β-CD

包含前后的主-客体性质变化。主体、客体、主-客包合物和主-客物理混合物之间在结构性质与微观形貌上存在着显著差异，这些差异揭示了包合物的形成。DSC、TG、溶解度和稳定性实验显示主-客包合物具有了新的热性质，更好水溶性和更加优异的稳定性，说明 HP-β-CD 是 VIN 良好的药物载体。采用 <sup>1</sup>H-、2D-NMR 分析了 VIN 与 HP-β-CD 的主客体结合模式，H-3 和 H-Me 位于 HP-β-CD 的大口端，H-5 位小口端，包含前、后 HP-β-CD 的 H-3、H-5 变化较大，可推测 VIN 是从 HP-β-CD 的大口端进入，此外根据包合物的 NOESY 相关点解析得出 VIN

是使其 a 环进入 HP- $\beta$ -CD 的空腔中。

量化计算显示了 VIN 以其 a 环从 HP- $\beta$ -CD 的大口端进入更有利于包合物的形成。此外, 该包合物的生成是放热的非自发进行的, 包合物形成的驱动力源于熵焓协同驱动和氢键相互作用。分子对接模拟出的最优包合模式与量化计算、核磁共振分析结构一致。分子动力学显示了经 10 ns 的动力学模拟后可发现药物分子已基本深入空腔, 这也是水溶性显著改善的原因, 因此疏水作用也是包合物形成的驱动力之一。

综上所述, 本研究采用实验和理论的方法对包合物形成过程、水溶性和稳定性进行了研究, 在实验与理论层面说明了 HP- $\beta$ -CD 对改善 VIN 的水溶性、稳定性具有一定的优势。清晰的主-客体包合模式分析将对今后该超分子药物的定量构效关系探讨提供理论参考。同时, 本研究将为 VIN 在医药产品的设计研发中提供参考, 但还存在载药量过低的不足, 目前 VIN 片剂的临床服用量为 5 mg、缓释胶囊为 30 mg, 但是 VIN 的生物利用度仅为 20%<sup>[28]</sup>, HP- $\beta$ -CD 对 VIN 生物利用度的影响和临床服用量还有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Na R, Liu J J, Yang D L, *et al.* Identification of vincamine indole alkaloids producing endophytic fungi isolated from *Nerium indicum*, Apocynaceae [J]. *Microbiological Res*, 2016, 192: 114-121.
- [2] 王金糖, 李芳茹, 王增援, 等. 薄叶山橙中生物碱成分及其抑制肿瘤细胞增殖活性筛选 [J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30(11): 1870-1877.
- [3] 张育号, 张得钧, 张本印. 具有降血糖活性的生物碱及其作用机制 [J]. *中草药*, 2018, 49(15): 3692-3702.
- [4] Dessouki A M E, Mai A E F, Awad A S, *et al.* Zafirlukast and vincamine ameliorate tamoxifen-induced oxidative stress and inflammation: Role of the JNK/ERK pathway [J]. *Life Sci*, 2018, 202: 78-88.
- [5] 高贤, 单淇, 辛宁, 等. 长春花化学成分和药理作用研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2011, 26(4): 274-277.
- [6] Ren N, Liu J J, Yang D L, *et al.* Identification of vincamine indole alkaloids producing endophytic fungi isolated from *Nerium indicum*, Apocynaceae [J]. *Microbiol Res*, 2016, 192(2016): 114-121.
- [7] 赵芳, 杨云汉, 赵雪秋, 等. 延胡索乙素与  $\beta$ -环糊精及其衍生物的包合行为研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(15): 3609-3618.
- [8] 马可, 张勇军, 邓桦, 等. 氟苯尼考- $\beta$ -环糊精包合物的制备与结构表征 [J]. *中国抗生素杂志*, 2018, 43(2): 223-227.
- [9] 杨建文, 任晓亮, 戚爱棣. 环糊精及其衍生物在中药提取中的应用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2015, 38(2): 208-213.
- [10] 孙勇兵, 黄花, 胡律江, 等.  $\beta$ -环糊精聚乙二醇羟基喜树碱高聚物的合成及其载药量研究 [J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(8): 1859-1864.
- [11] 孙立丽, 任晓亮, 王萌, 等. 6 种环糊精对中药复方血脂宁成分的选择性提取作用分析 [J]. *中草药*, 2017, 48(14): 2857-2863.
- [12] An L N, Dang Y J, Hu C H, *et al.* Physicochemical properties and gastric mucosa irritation of cantharidin-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(3): 224-229.
- [13] Matshetshe K I, Parani S, Manki S M *et al.* Preparation, characterization and *in vitro* release study of  $\beta$ -cyclodextrin/chitosan nanoparticles loaded *Cinnamomum zeylanicum* essential oil [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 118(Part A): 676-682.
- [14] Sali N, Csepregi R, Kószegi T, *et al.* Complex formation of flavonoids fisetin and geraldol with  $\beta$ -cyclodextrins [J]. *J Lumin*, 2018, 194: 82-90.
- [15] 邓晋丽, 马莉, 韩峰, 等. 家兔鼻腔给药冰片-羟丙基- $\beta$ -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.
- [16] 李学林, 陈鹏举, 桂新景, 等. 电子舌在羟丙基- $\beta$ -环糊精抑苦规律研究中的应用 [J]. *中草药*, 2017, 48(20): 4235-4244.
- [17] Yang L J, Chang Q, Zhou S Y, *et al.* Host-guest interaction between brazillin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Preparation, inclusion mode, molecular modelling and characterization [J]. *Dyes Pigments*, 2018, 150: 193-201.
- [18] Yang L J, Xia S, Ma S X, *et al.* Host-guest system of hesperetin and  $\beta$ -cyclodextrin or its derivatives: Preparation, characterization, inclusion mode, solubilization and stability [J]. *Mater Sci Eng C*, 2016, 59: 1016-1024.
- [19] Yang L J, Wang S H, Zhou S Y, *et al.* Supramolecular system of podophyllotoxin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Characterization, inclusion mode, docking calculation, solubilization, stability and cytotoxic activity [J]. *Mater Sci Eng C*, 2017, 76: 1136-1145.
- [20] 赵芳, 赵雪秋, 常清, 等. 虫草素与羟丙基- $\beta$ -环糊精的包合行为及性能研究 [J]. *分析化学*, 2017, 45(10): 1547-1555.

- [21] 任 科, 张志荣, 鞠静红, 等. 穿心莲内酯-羟丙基- $\beta$ -环糊精包合物的鉴定和热力学稳定性研究 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 518-521.
- [22] Duan Q P, Zhao W J, Lu K. Synthesis of a water-soluble pillar[6]arene dodecaamine and its selective binding of acidic amino acids in water [J]. *Tetrahedron Lett*, 2017, 58(46): 4403-4406.
- [23] 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.
- [24] Yildiz Z I, Celebioglu A, Kilic M E, *et al.* Menthol/cyclodextrin inclusion complex nanofibers: Enhanced water-solubility and high-temperature stability of menthol [J]. *J Food Eng*, 2018, 224: 27-36.
- [25] Gejji S P, Taurian O E, Lunell S. Theoretical study of the short asymmetric[O...H...O]hydrogen bond in solid potassium hydrogen diformate, including electron correlation [J]. *J Phys Chem*, 1990, 94(11): 4449-4452.
- [26] Steiner T, Saenger W. Geometry of oxygen hydrogen bonds in carbohydrate crystal structures. Analysis of neutron diffraction data [J]. *J Am Chem Soc*, 1992, 114(26): 10146-10154.
- [27] Pahari B, Chakraborty S, Sengupta P K. Molecular insight into the inclusion of the dietary plant flavonol fisetin and its chromophore within a chemically modified  $\gamma$ -cyclodextrin: Multi-spectroscopic, molecular docking and solubility studies [J]. *Food Chem*, 2018, 260: 221-230.
- [28] Hasa D, Perissutti B, Dall'Acqua S, *et al.* Rationale of using Vinca minor Linne dry extract phytocomplex as a vincamine's oral bioavailability enhancer [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 84(1): 138-144.