

## • 药剂与工艺 •

漆黄素与 $\beta$ -环糊精衍生物的包合行为及性能研究

李燕华<sup>1</sup>, 王淑慧<sup>2</sup>, 李俊鹏<sup>1</sup>, 李文琳<sup>1</sup>, 左川<sup>1\*</sup>, 赵芳<sup>3\*</sup>

1. 贵研铂业股份有限公司 稀贵金属综合利用新技术国家重点实验室, 云南 昆明 650156

2. 云南民族大学化学与环境学院, 云南 昆明 650500

3. 洱源县检验检测院, 云南 大理 671200

**摘要:** 目的 制备漆黄素 (fisetin, FIT) 与  $\beta$ -环糊精衍生物的包合物, 并对其包合行为和包合物的水溶性、稳定性进行研究。方法 通过超声法制备了漆黄素与 2-羟丙基- $\beta$ -环糊精 [(2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin, HP- $\beta$ -CD]、2,6-二甲基- $\beta$ -环糊精 [(2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin, DM- $\beta$ -CD] 和磺丁基醚- $\beta$ -环糊精 (sulfobutyl ether- $\beta$ -cyclodextrin, SBE- $\beta$ -CD) 的包合物; 采用核磁共振氢谱 (<sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>2</sup>D-NMR)、X 射线粉末衍射 (X-ray powder diffraction, XRD)、差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC)、扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM)、紫外-可见光谱法 (ultraviolet-visible spectrometry, UV)、Job 曲线法对包合物进行表征; 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的测试。结果 核磁共振 (<sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>2</sup>D-NMR) 分析表明, 漆黄素从小口端进入 HP- $\beta$ -CD 空腔, 从大口端进入 DM- $\beta$ -CD 和 SBE- $\beta$ -CD 空腔。漆黄素与 HP- $\beta$ -CD、DM- $\beta$ -CD 和 SBE- $\beta$ -CD 形成包合物后, 其溶解度从 0.05 mg/mL 分别提高到了 3.45、3.70、4.60 mg/mL。结论 漆黄素与  $\beta$ -环糊精衍生物形成包合物后, 其溶解度、热稳定性及生物环境稳定性得到明显提高。

**关键词:** 漆黄素;  $\beta$ -环糊精; 包合物; 水溶性; 稳定性; 溶解度

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)16-4797-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.16.005

## Study on inclusion behavior and properties of fisetin with $\beta$ -cyclodextrin derivatives

LI Yan-hua<sup>1</sup>, WANG Shu-hui<sup>2</sup>, LI Jun-peng<sup>1</sup>, LI Wen-lin<sup>1</sup>, ZUO Chuan<sup>1</sup>, ZHAO Fang<sup>3</sup>

1. State Key Laboratory of Advanced Technologies for Comprehensive Utilization of Platinum Metals, Sino-Platinum Metals Co., Ltd., Kunming 650500, China

2. School of Chemistry and Environment, Yunnan Minzu University, Kunming 650106, China

3. Eryuan County Inspection and Testing Institute, Dali 671200, China

**Abstract: Objective** To prepare fisetin (FIT) and  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) derivatives inclusion complexes [hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD), dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin (DM- $\beta$ -CD), sulfobutyl ether- $\beta$ -cyclodextrin (SBE- $\beta$ -CD)] and explore their inclusion behavior and the water solubility and stability of inclusion complexes. **Methods** The inclusion complexes of FIT with HP- $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD and SBE- $\beta$ -CD were prepared by ultrasonic method. Optimize the best inclusion process with drug loading as an index. Inclusion complexes was characterized by <sup>1</sup>H-NMR and <sup>2</sup>D-NMR, X-ray powder diffraction (XRD), differential scanning calorimetry (DSC), scanning electron microscope (SEM), ultraviolet-visible spectrometry (UV-Vis), and Job curve methods; 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** Nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR and <sup>2</sup>D-NMR) analysis showed that FIT entered

收稿日期: 2021-04-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U1602271); 云南省科技计划项目 (2018ZE001); 云南省科技计划项目 (202002AB080001)

作者简介: 李燕华 (1991—), 男, 工程师, 研究方向为超分子化学。E-mail: lyh@ipm.com.cn

\*通信作者: 左川 (1979—), 男, 高级工程师, 研究方向为高分子材料化学。E-mail: zuochuan@ipm.com.cn

赵芳 (1993—), 女, 工程师, 研究方向为超分子化学。E-mail: 2232550275@qq.com

the HP- $\beta$ -CD cavity from the small mouth end, and entered the DM- $\beta$ -CD and SBE- $\beta$ -CD cavity from the big mouth end. The solubility of FIT was increased from 0.05 mg/mL to 3.45, 3.70, 4.60 mg/mL for HP- $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD and SBE- $\beta$ -CD, respectively.

**Conclusion** The solubility, thermal stability and biological environment stability had been significantly improved after the formation of inclusion complex.

**Key words:** fisetin;  $\beta$ -cyclodextrin; inclusion complex; water solubility; stability; solubility

漆黄素 (fisetin, FIT) 是黄酮类黄色针状结晶化合物, 从漆树科植物木蜡树 *Toxicodendron sylvestri* (Sieb. et Zucc.) O. Kuntze 中提取而来<sup>[1-2]</sup>, 广布在蔬菜和水果中<sup>[3-4]</sup>。因其 B 环上具有邻二酚羟基的特殊结构使漆黄素具有较强的药理作用<sup>[5-8]</sup>, 如抗病毒、治疗黄疸型病毒性肝炎<sup>[9]</sup>; 抑制细胞凋亡<sup>[10]</sup>、人黑色素瘤<sup>[11]</sup>、抗血管增生<sup>[12]</sup>、神经保护<sup>[13-14]</sup>、抗癌<sup>[15-16]</sup>等药理活性。尽管药物漆黄素在预防和治疗疾病中有显著的效果, 但其较低的水溶性 (溶解度小于 1 mg/mL)<sup>[16]</sup>, 化学不稳定性, 脂溶性和溶出率低, 代谢较快等性质限制了其药物制剂和临床应用<sup>[17]</sup>。

$\beta$ -环糊精 ( $\beta$ -cyclodextrins,  $\beta$ -CD) 是由  $\alpha$ -1,4-糖苷键连接的寡聚糖, 具有亲脂空腔和亲水外壁, 独特的理化性质使得环糊精分子可成功地作为药物载体<sup>[18-19]</sup>。在药物应用中, 环糊精水溶性好且低毒、易降解, 可改善药物的溶解性, 提高制剂质量。本研究对药物漆黄素分子与 2-羟丙基- $\beta$ -环糊精 [(2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin, HP- $\beta$ -CD]、2,6-二甲基- $\beta$ -环糊精 [(2,6-di-*O*-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin, DM- $\beta$ -CD]、磺丁基醚- $\beta$ -环糊精 (sulfobutyl ether- $\beta$ -cyclodextrin, SBE- $\beta$ -CD) 包合物的水溶性和稳定性进行研究, 为药物漆黄素的临床应用提供一条有效、低毒的新途径。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

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。

### 1.2 材料

漆黄素 ( $C_{15}H_{10}O_6$ ), 相对分子质量 (FW) = 286.23, 质量分数 >98%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; HP- $\beta$ -CD (FW=1 541.54)、DM- $\beta$ -CD

(FW=1 331.36) 和 SBE- $\beta$ -CD (FW=1 451.29), 北京百灵威科技有限公司, 未经纯化直接使用; 其余试剂均为分析纯试剂; 所有实验用水均为超纯水。

## 2 方法

### 2.1 漆黄素/ $\beta$ -环糊精衍生物 (FIT/ $\beta$ -CDs) 物理混合物的制备

按物质的量比为 1:1 称取漆黄素 (0.01 mmol/L) 和  $\beta$ -CDs (0.01 mmol/L) 样品于玛瑙研钵中, 加入少量水, 研磨使其充分混合均匀, 减压真空干燥, 得到 3 种 FIT/ $\beta$ -CDs (FIT/HP- $\beta$ -CDs、FIT/DM- $\beta$ -CDs、FIT/SBE- $\beta$ -CDs) 物理混合物。

### 2.2 FIT/ $\beta$ -CDs 包合物的制备

室温条件下, 分别称取 HP- $\beta$ -CD (14.6 mg)、DM- $\beta$ -CD (13.3 mg)、SBE- $\beta$ -CD (11.4 mg) 溶于 4 mL 蒸馏水, 超声 30 min 后, 逐滴加入用少量乙醇溶解的漆黄素 (4.7 mg), 40 °C 超声 1 h 后, 冷却至室温, 0 °C 避光放置 2 d, 除去反应液中乙醇, 用 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜滤过, 除去未反应的漆黄素, 将滤液减压蒸干, 得黄色固体粉末, 真空干燥, 分别得到 FIT/HP- $\beta$ -CD (产率 74%)、FIT/DM- $\beta$ -CD (产率 80%)、FIT/SBE- $\beta$ -CD (产率 72%) 包合物。

### 2.3 紫外光谱测定

紫外光谱测定使用 Agilent 8453 紫外-可见光谱仪, 1 cm 石英比色皿 (1 cm $\times$ 1 cm $\times$ 4 cm)。实验测定: 室温条件, 溶剂为水-乙醇 (4:1), 保持漆黄素的浓度为 0.016 mmol/L, 分批次加入  $\beta$ -CDs, 静置 15 min 后进行紫外光谱测定 (波长扫描范围 220~800 nm), 浓度梯度如表 1 所示。

### 2.4 线性关系考察

配制浓度为 0.012、0.016、0.020、0.024、0.028、0.032、0.036、0.04、0.044、0.048 mmol/L 的漆黄素对照品溶液, 并在最大吸收波长 365 nm 处测得相应吸光度 (A) 分别为 0.268 1、0.336 1、0.425 5、0.511 9、0.574 1、0.660 5、0.747 9、0.820 3、0.891 2、0.969 9。以漆黄素溶液的浓度 (C) 作横坐标, A 值为纵坐标绘制漆黄素的标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程为  $A=19.65 C-0.030 99$ ,  $r$  为 0.999 22, 线性范围为 0.012~0.048 mmol/L。

表1 紫外-可见光谱测定中在 pH 3.0 和 pH 10.5 条件下加入 β-CDs 衍生物的浓度变化

Table 1 Concentration changes of β-cyclodextrin derivatives at pH 3.0 and pH 10.5 in UV-vis spectrophotometric experiments

主体	pH 值	浓度梯度/(mmol·L <sup>-1</sup> )
HP-β-CD	3.0	0, 0.079 09, 0.112 99, 0.161 46, 0.230 59, 0.329 42, 0.470 60, 0.672 28, 0.960 40, 1.372 00, 1.900 00
	10.5	0, 0.079 09, 0.112 99, 0.161 46, 0.230 59, 0.329 42, 0.470 59, 0.672 28, 0.960 40, 1.372 00
DM-β-CD	3.0	0, 0.079 09, 0.112 99, 0.161 46, 0.230 59, 0.329 42, 0.470 60, 0.672 28, 0.960 40, 1.372 00
	10.5	0, 0.112 99, 0.161 46, 0.230 59, 0.329 42, 0.672 28, 0.960 40, 1.372 00, 1.960 00, 2.800 00, 4.000 00
SBE-β-CD	3.0	0, 0.112 99, 0.161 46, 0.230 59, 0.329 42, 0.470 60, 0.672 28, 0.960 40, 1.372 00, 1.960 00, 2.800 00, 4.000 00
	10.5	0, 0.161 46, 0.230 59, 0.329 42, 0.470 59, 0.672 28, 0.960 40, 1.372 00, 1.960 00, 2.800 00, 4.000 00

### 2.5 核磁共振测定

<sup>1</sup>H-NMR 和二维 ROESY 使用瑞士 Bruker 公司 Avance DRX 500 MHz 核磁共振仪。将 HP-β-CD、DM-β-CD、SBE-β-CD 及 FIT/HP-β-CD、FIT/DM-β-CD、FIT/SBE-β-CD 溶于 99.98% D<sub>2</sub>O 中，滤过后于 298 K 下 [以三甲基硅 (TMS) 为基准] 测定核磁共振氢谱 (<sup>1</sup>H-NMR) 和二维核磁共振氢谱 (<sup>2</sup>D-NMR)。

### 2.6 X 射线粉末衍射 (XRD) 测定

XRD 使用 D/max-3B 衍射仪; 实验操作: Cu Kα ( $k=0.154\ 60\ \text{nm}$ ), 40 kV, 100 mA,  $2\theta=0.02^\circ$  到  $2\theta=3^\circ\sim 50^\circ$ , 速率  $5^\circ/\text{min}$ ; 样品: 漆黄素、HP-β-CD、DM-β-CD、SBE-β-CD、FIT/HP-β-CD、FIT/DM-β-CD、FIT/SBE-β-CD 和 3 种 FIT/β-CDs 物理混合物。

### 2.7 热分析测定

分别取质量约为 5~15 mg 的漆黄素、HP-β-CD、DM-β-CD、SBE-β-CD 及 FIT/HP-β-CD、FIT/DM-β-CD、FIT/SBE-β-CD 样品, 使用型号为德国耐驰公司的 STA449F3 进行热分析测定差示扫描量热 (differential scanning calorimetry, DSC) 曲线和热重分析 (thermogravimetric analysis, TG) 曲线。升温速率  $12\ ^\circ\text{C}/\text{min}$ , 范围  $20\sim 500\ ^\circ\text{C}$ , N<sub>2</sub> 体积流量为  $70\ \text{mL}/\text{min}$ 。

### 2.8 SEM 观察

SEM 图通过 FEI PHENO 台式扫描电镜仪拍摄得到。测试条件: 电子加速电压为 20 kV, 分辨率可放大 700、1500、3000 倍, 甚至 10 000 倍; 样品: 漆黄素、HP-β-CD、DM-β-CD、SBE-β-CD、FIT/HP-β-CD、FIT/DM-β-CD、FIT/SBE-β-CD 和 3 种 FIT/β-CDs 物理混合物。

### 2.9 包合率的测定

取 FIT/HP-β-CD、FIT/DM-β-CD 及 FIT/SBE-β-CD 包合物真空减压干燥 (温度  $60\ ^\circ\text{C}$ ), 称适量

的干燥物, 加入 2 mL 蒸馏水, 搅拌 15 min, 用  $0.45\ \mu\text{m}$  滤膜过滤, 取少许滤液稀释, 摇匀于 365 nm 波长下测定 A 值, 代入“2.4”项中回归方程算出客体药物的含量, 并计算出包合物 FIT/HP-β-CD、FIT/DM-β-CD 及 FIT/SBE-β-CD 的包合物得率和包合率, 实验重复 3 次。

### 2.10 水溶性实验

在室温 pH 7.0 的条件下, 取过量的漆黄素、包合物 FIT/HP-β-CD、FIT/DM-β-CD 及 FIT/SBE-β-CD, 加入 2 mL 水, 避光涡旋一段时间后用  $0.45\ \mu\text{m}$  滤膜滤过除去未溶解物, 减压旋蒸, 得到黄色固体物, 计算出该包合物与原药物漆黄素相比水溶性的增加量。

### 2.11 模拟生物体环境下的稳定性实验

取漆黄素、FIT/HP-β-CD、FIT/DM-β-CD 及 FIT/SBE-β-CD 包合物于 25 mL 棕色量瓶中, 分别用 pH 1.5 和 pH 7.6 的 2 种缓冲溶液溶解 (溶剂为水-乙醇 4:1), 静置 1 h 至溶液平衡, 固定波长为 363 nm, 药液作为对照, 每隔  $(12\pm 2)\ \text{h}$  对漆黄素的 A 值进行跟踪测量。

## 3 结果与讨论

### 3.1 Job's 曲线的测定

确定化学计量比可采用等摩尔连续递变法, 即 Job 法<sup>[20]</sup>。维持漆黄素和 HP-β-CD 的总浓度为  $0.08\ \text{mmol}/\text{L}$ , 在 pH 3.0 的缓冲溶液中分别配置一系列浓度的漆黄素和 HP-β-CD 混合液, 然后在 365 nm 处测定 A 值, 使两者的物质的量之比 (漆黄素的摩尔分数) 在 0~1 内变化<sup>[21-22]</sup>。以 A 值与漆黄素的摩尔分数作图, 结果见图 1, 从曲线中可知最高点时相对应的横坐标为 0.5。由此可确定主客体包合物 FIT/HP-β-CD 的包合化学计量比为 1:1。

### 3.2 紫外光谱滴定

为了研究主客体系的定量包合行为, 在 pH 值

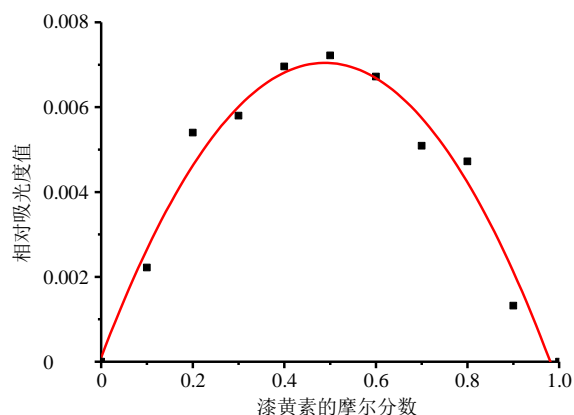


图1 漆黄素与FIT/HP-β-CD包合物在pH 3.0中的Job曲线  
Fig. 1 Job plots for fisetin and FIT/HP-β-CD complex at pH 3.0

分别为3.0、10.5<sup>[23-24]</sup>的条件下进行紫外光谱滴定实验,结果如图2所示(实验过程中,保持溶液的酸碱性和所测的客体漆黄素的浓度不变)。

若漆黄素与β-CD的包结配位计量比为1:1,则主体(β-CD)和客体(漆黄素)的配位包合可用公式(1)表示。

$$[\text{FIT}] \cdot [\beta\text{-CDs}] \xrightleftharpoons{K_s} [\text{FIT} \cdot \beta\text{-CDs}] \quad (1)$$

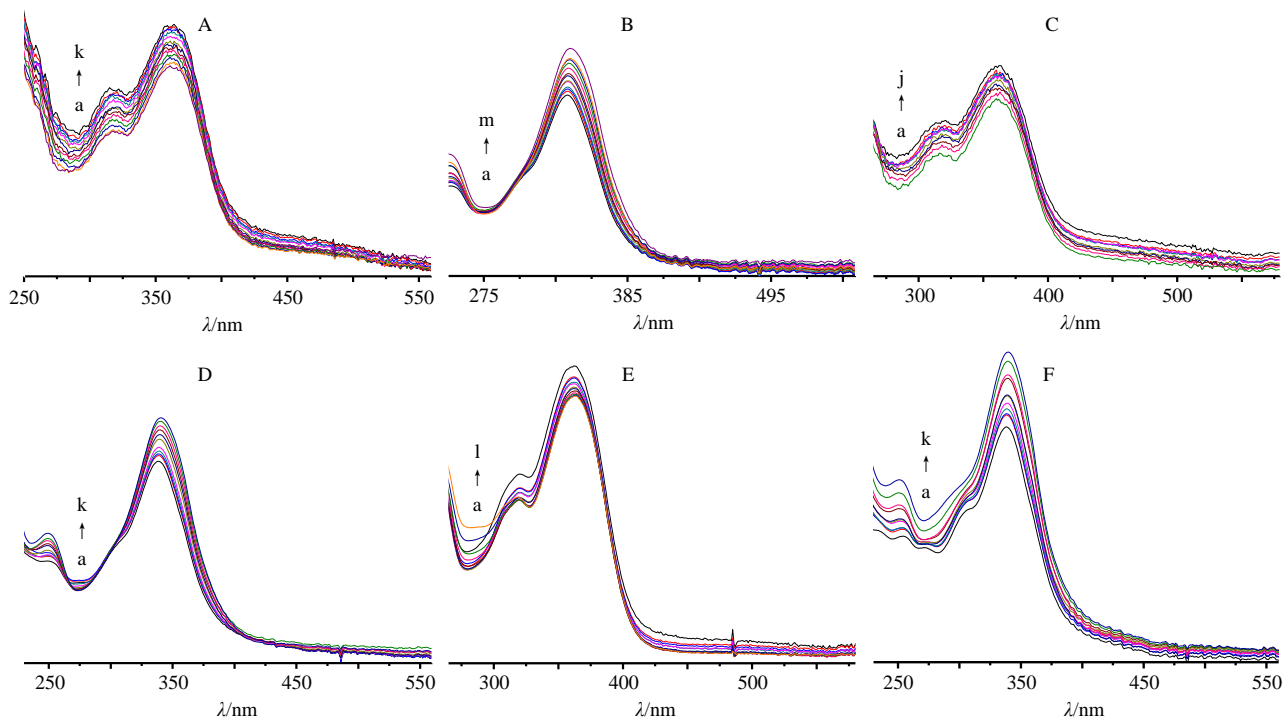
其中, [FIT·β-CDs]、[FIT]、[β-CDs]分别是FIT/β-CDs包合物、漆黄素、β-CDs平衡时浓度, [FIT]<sub>0</sub>和[β-CDs]<sub>0</sub>分别是漆黄素和β-CDs的初始浓度。包合稳定常数(K<sub>s</sub>)可以通过公式(2)来计算。ΔA为有无β-CDs存在下漆黄素的A值的变化, Δε是主-客体包合前后的摩尔吸光系数变化。根据Lambert-Beer定律,可得FIT/β-CDs包合物的平衡浓度[FIT·β-CDs]可表示为吸光度变化(ΔA)除以摩尔吸光系数变化Δε(ΔA/Δε)。

$$K_s = \frac{[\text{FIT} \cdot \beta\text{-CDs}]}{[\text{FIT}] \cdot [\beta\text{-CDs}]} = \frac{(\Delta A / \Delta \epsilon)}{([\text{FIT}]_0 - \Delta A / \Delta \epsilon)([\beta\text{-CDs}]_0 - \Delta A / \Delta \epsilon)} \quad (2)$$

$$\Delta A = \{ \Delta \epsilon([\text{FIT}]_0 + [\beta\text{-CDs}]_0 + 1/K_s) \pm [ \Delta \epsilon^2([\text{FIT}]_0 + [\beta\text{-CDs}]_0 + 1/K_s)^2 - 4 \Delta \epsilon^2[\text{FIT}]_0 + [\beta\text{-CDs}]_0 ]^{1/2} \} \quad (3)$$

最终,可根据公式(3)得到由包合物β-CDs衍生物浓度下的ΔA,以及配位包合物的K<sub>s</sub>。

图3为漆黄素与β-CDs衍生物的包结配位实验值与理论值的曲线拟合结果,较好的线性关系显示主客体系形成的包合物的化学计量比为1:1,与



HP-β-CD(A: a→k 0~1.96 mmol·L<sup>-1</sup>, B: a→m 0~4.00 mmol·L<sup>-1</sup>) DM-β-CD(C: a→j 0~1.37 mmol·L<sup>-1</sup>, D: a→i 0~4.00 mmol·L<sup>-1</sup>) SBE-β-CD(E: a→i 0~4.00 mmol·L<sup>-1</sup>, F: a→k 0~4.00 mmol·L<sup>-1</sup>)  
HP-β-CD(A: a→k 0~1.96 mmol·L<sup>-1</sup>, B: a→m 0~4.00 mmol·L<sup>-1</sup>) DM-β-CD(C: a→j 0~1.37 mmol·L<sup>-1</sup>, D: a→k 0~4.00 mmol·L<sup>-1</sup>) SBE-β-CD(E: a→i 0~4.00 mmol·L<sup>-1</sup>, F: a→k 0~4.00 mmol·L<sup>-1</sup>)

图2 漆黄素在pH 3.0(A、C、E)和pH 10.5(B、D、F)的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 fisetin with different cyclodextrin at pH 3.0(A, C and E) and pH 10.5(B, D and F) buffer solution

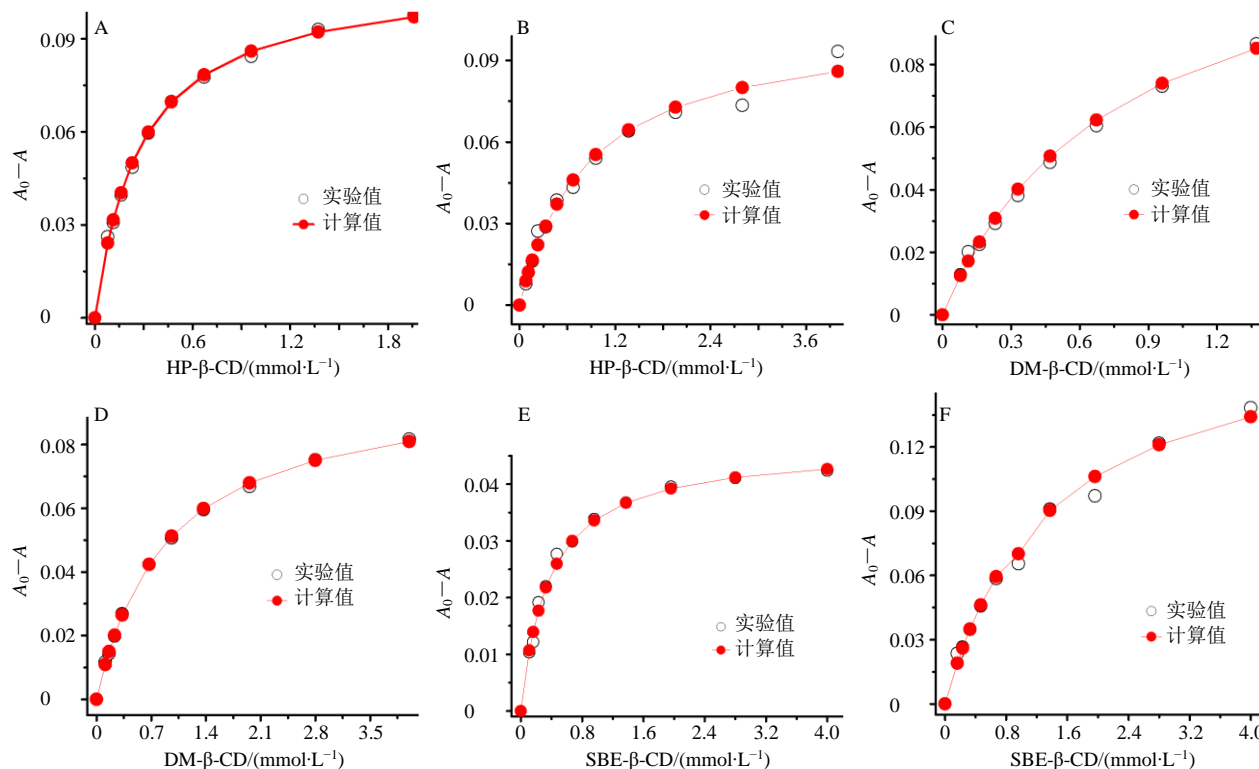


图3 包合物热力学变化的非线性最小二乘拟合曲线图 (A~F 同图2)

Fig. 3 Nonlinear least-squares analysis to calculate thermodynamic changes of complex (A—F same as figure 2)

Job 曲线得到的结果一致,同时证明假设是成立的。主客体配位包合物的稳定常数 ( $K_s$ , L/mol) 及相应的吉布斯自由能变化 ( $-\Delta G^\circ$ ) 经非线性最小二乘曲线拟合的方法得到<sup>[25]</sup>, 结果如表 2 所示 (表中数值是根据至少 7 个不同 $[\beta\text{-CDs}]$ 下得出的平均值, 标准偏差小于 $\pm 5\%$ )。

### 3.3 包含常数的讨论

**3.3.1 不同 pH 值对漆黄素与环糊精包含常数的影响** 通常,在溶液中环糊精与客体形成配位包合时, 主要存在亲脂作用、静电作用、范德华力、氢键等作用力。主客体复合物的形成实质是一个协同的过程

表 2 漆黄素与  $\beta\text{-CDs}$  衍生物在 pH 3.0 和 pH 10.5 中的  $K_s$  和  $-\Delta G^\circ$

Table 2  $K_s$  and  $-\Delta G^\circ$  for inclusion complexation of fisetin with  $\beta\text{-cyclodextrin}$  derivatives at pH 3.0 and pH 10.5

主体	$K_s/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\lg K_s$	$-\Delta G^\circ/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	pH 值
HP- $\beta\text{-CD}$	3680	3.565 2	20.353	3.0
HP- $\beta\text{-CD}$	1192	3.075 7	17.558	10.5
DM- $\beta\text{-CD}$	1356	3.131 7	17.878	3.0
DM- $\beta\text{-CD}$	1122	3.049 4	17.408	10.5
SBE- $\beta\text{-CD}$	2726	3.434 9	19.609	3.0
SBE- $\beta\text{-CD}$	746	2.872 2	16.397	10.5

程,这一过程可包括主体空腔间溶剂分子的释放、客体分子的脱溶剂、溶剂间分子的重组、主客体间弱键的形成。一般而言,环糊精在  $2 < \text{pH} < 11$  时基本呈中性,在溶液中环糊精的-OH 与客体药物间的非共价键及其空腔与客体药物分子间的疏水作用促使了包合物的形成。从表 2 可知 pH 为 3.0 较 pH 为 10.5 的漆黄素与环糊精包含常数大,即  $K_{\text{pH } 3.0} > K_{\text{pH } 10.5}$ 。客体分子的疏水性影响配位包合物的形成,这可能与漆黄素客体分子型体有关。

在水溶液中,漆黄素分子中的 4 个羟丙基 (-OH) 随溶液的 pH 值的变化而解离,有不同的分子型体。Slabbert 等<sup>[26]</sup>曾报道过黄酮类药物和儿茶酚类化合物的  $\text{p}K_a$  值,经比较黄酮类药物和不同取代基的儿茶酚类化合物的  $\text{p}K_a$  值,推断出类黄酮药物 A 环上的 7-OH 的  $\text{p}K_a$  为 6.74~7.07; B 环上 3'-OH 和 4'-OH 的  $\text{p}K_a$  为 8.77~9.02 和 13.20~13.25。在此研究基础上进一步得出药物漆黄素的解离为  $7\text{-OH} > 3'\text{-OH} > 4'\text{-OH} > 3\text{-OH}$ 。

从图 4 可看出当溶液成酸性条件时,漆黄素主要以中性型体存在,而在碱性和中性条件下,漆黄素的中性型体减少,主要以离子型体存在。因而溶液 pH 3.0 较 pH 10.5 疏水性和包含常数大。

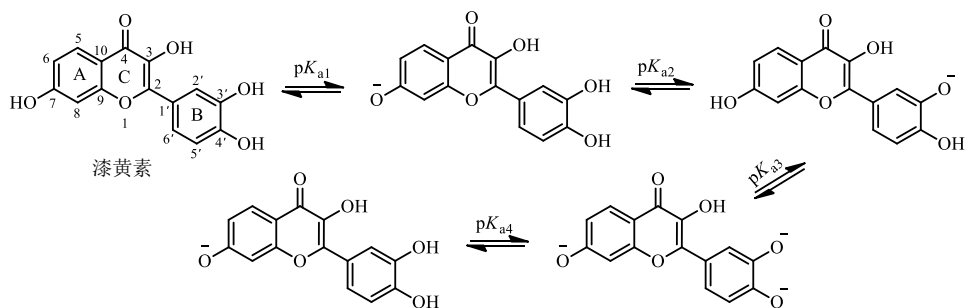


图4 漆黄素在水中的平衡结构式

Fig. 4 Balance structure formula of fisetin in water

**3.3.2 不同 β-CDs 对包合常数的影响** 在溶液的 pH 值保持不变时，通常几何匹配 (size-fit)、形状匹配 (shape-fit) 以及电荷匹配 (charge-fit) 3 个效应影响漆黄素与不同取代的 β-CDs 的配位包合物形成，从表 2 可知当 pH 值为 3.0 时，漆黄素与 β-环糊精衍生物的  $K_s$  呈现以下规律，即  $K_s$ : HP-β-CD > SBE-β-CD > DM-β-CD。

通过比较，HP-β-CD 和 SBE-β-CD 较 DM-β-CD 的  $K_s$  高，原因可能是 HP-β-CD 中的羟基链可能更容易与漆黄素分子形成相互作用力，而 DM-β-CD 具有较多的甲氧基而不是羟基，且拥有一个较大的空腔开口和更深的空腔，与客体的分子间氢键减弱，一定程度上削弱了主客体间的包合作用。

**3.3.3 核磁共振 (<sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>2</sup>D-NMR) 分析** 为了研究漆黄素与 β-CD 衍生物的配位包合模式，本研究比较了漆黄素在主体环糊精存在时的 <sup>1</sup>H-NMR 谱图和空白 β-CDs 的 <sup>1</sup>H-NMR 谱图。由于漆黄素水溶性较低，在 D<sub>2</sub>O 溶剂中不出现核磁信号，而漆黄素包合物的 <sup>1</sup>H-NMR 谱图中较清晰地出现了漆黄素质子峰，这表明环糊精能显著提高漆黄素的水溶性。如图 5 所示，大多数漆黄素质子信号出现在 δ 6.5~10.0，同环糊精质子信号（通常在 δ 3.0~5.5）明显区分来。

**FIT/HP-β-CD 包合物:** <sup>1</sup>H-NMR(500MHz, D<sub>2</sub>O, TMS): δ 6.84~10.00 (m, 10H, FIT 质子), 3.40~3.90 (m, 100H, HP-β-CD 的 H-2~6 位氢、亚甲基氢和 2、3、6 甲基氢), 4.96~5.10 (s, 7H, HP-β-CD 的 H-1 质子), 1.03~1.04 (s, 3H, HP-β-CD 的 H-CH<sub>3</sub> 质子)。

**FIT/DM-β-CD 包合物:** <sup>1</sup>H-NMR(500 MHz, D<sub>2</sub>O, TMS): δ 6.89~10.00 (m, 10H, FIT 质子), 3.00~3.76 (m, >90H, DM-β-CD 的 H-2~6 位和 2,6-二甲氧基氢), 5.94~5.14 (s, 7H, DM-β-CD 的 H-1 质子)。

**FIT/SBE-β-CD 包合物:** <sup>1</sup>H-NMR (500MHz,

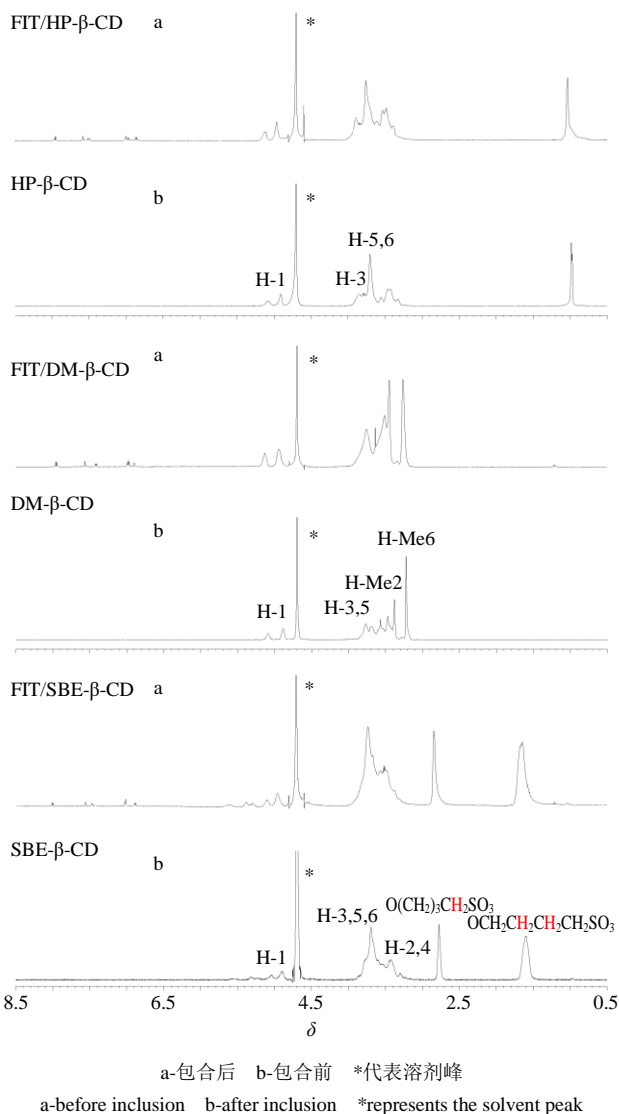


图5 β-CDs 在包含漆黄素前后时的 <sup>1</sup>H-NMR 谱图 (D<sub>2</sub>O, 25 °C)

Fig. 5 β-CDs <sup>1</sup>H-NMR spectrum (D<sub>2</sub>O, 25 °C) before and after inclusion with fisetin

D<sub>2</sub>O, TMS): δ 6.86~10.00 (m, 10H, FIT 质子), 3.20~3.38 (m, 6H, SBE-β-CD 的 OCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>,

2.83 [m, 6H, SBE-β-CD的 O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>], 1.64 [m, 12H, SBE-β-CD的 OCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>], 5.09~5.38 (s, 7H, SBE-β-CD的 H-1 质子)。

在 <sup>1</sup>H-NMR 谱图中, 通过比较药物漆黄素的质子峰与环糊精 H-1 质子峰的积分面积比例, 可计算出环糊精与药物漆黄素包合物的计量比。结果显示 FIT/HP-β-CD、FIT/DM-β-CD 及 FIT/SBE-β-CD 包合物的化学计量比为 1 : 1。为了进一步研究药物与环糊精的包合模式, 对有无漆黄素存在下的 β-CDs (HP-β-CD、DM-β-CD、SBE-β-CD) 质子的化学位移做了比较, 结果见表 3、4。从表 3 中发现, 包合

表 3 HP-β-CD、DM-β-CD 及 FIT/HP-β-CD、FIT/DM-β-CD 的 <sup>1</sup>H-NMR 位移值 (δ)

Table 3 <sup>1</sup>H-NMR displacement value (δ) of HP-β-CD, DM-β-CD and FIT/HP-β-CD, FIT/DM-β-CD

氢位	峰形	δ			
		HP-β-CD	FIT/HP-β-CD 包合物	DM-β-CD	FIT/DM-β-CD 包合物
H-1	d	4.91	4.96	5.08	5.13
H-2	dd	3.55	3.60	3.28	3.34
H-3	dd	3.86	3.89	3.57	3.63
H-4	dd	3.43	3.48	3.68	3.64
H-5	m	3.70	3.76	3.77	3.76
H-6	dd	3.70	3.75	3.56	3.51
H-Me	dd	0.98	1.03	-	-
H-Me2	s	-	-	3.38	3.44
H-Me6	s	-	-	3.22	3.26

表 4 SBE-β-CD 及 FIT/SBE-β-CD 包合物的 <sup>1</sup>H-NMR 位移值 (δ)

Table 4 <sup>1</sup>H-NMR displacement value (δ) of SBE-β-CD and FIT/SBE-β-CD

氢位	峰形	δ	
		SBE-β-CD	FIT/SBE-β-CD 包合物
H-1	d	4.90	4.95
H-2	dd	-	3.37
H-3	dd	3.51	3.57
H-4	dd	-	3.47
H-5	m	3.69	3.73
H-6	dd	3.62	3.67
H-R <sub>1</sub>	m	3.44	3.52
H-R <sub>2</sub>	m	2.77	2.83
H-R <sub>3</sub>	m	1.60	1.64

R<sub>1</sub>-OCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> R<sub>2</sub>-O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> R<sub>3</sub>-OCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>

前后对 HP-β-CD 上的 H 的化学位移发生明显变化 (δ 0.03~0.06), 产生这种变化的原因可能是 HP-β-CD 分子与漆黄素形成了氢键。值得注意的是, HP-β-CD 上的 H-3 变化了 δ 0.03, 而 H-5 变化了 δ 0.06, 另外环糊精的立体结构中, H-3、H-5 均位于环糊精的空腔内, 且 H-3 位于大口端, H-5 位于小口端, 综上可推断客体分子漆黄素是通过 HP-β-CD 的小口端进入环糊精空腔包合的。

如表 3 示, DM-β-CD 的相应化学位移变化为 δ 0.01~0.06, H-3 (δ 0.06) 较 H-5 (δ 0.01) 的变化较大, 结合环糊精的立体结构分析可知, 客体分子漆黄素是通过 DM-β-CD 的大口端进入环糊精空腔包合的。如表 4 示, SBE-β-CD 的相应化学位移变化为 δ 0.01~0.06, H-3 质子 (δ 0.06) 较 H-5 (δ 0.04) 的变化较大, 结合环糊精的立体结构分析可知: 客体分子漆黄素是通过 SBE-β-CD 的大口端进入环糊精空腔包合的。

近年来, 通过 <sup>2</sup>D NMR 观察分子间的偶极交叉相关, 成为研究主体-客体分子间空间位置的重要工具。在 NOESY 或 ROESY 二维谱图中若 2 个质子的空间位置距离很近在 0.4 nm 内<sup>[27]</sup>, 其对应处可产生 1 个 NOE 交叉相关点。在本实验中使用了 ROESY 二维谱图的交叉相关来研究环糊精和漆黄素的配位包结行为, 以获得更多的分子空间结构信息。

图 6-a 显示了药物漆黄素与 HP-β-CD 之间配位包合的 ROESY 二维谱图。从 ROESY 谱图中可以看出, HP-β-CD 空腔内部的 H-3 和 H-5 质子与漆黄素中 B 环部分的 H-6、7、8 位和 A 环 H-1 质子有 NOE 相关 (相关峰 A 及其放大图)。A 相关点表明, 漆黄素分子的 B 环和 A 环部分进入了 HP-β-CD 空腔内。

图 6-b 显示了漆黄素与 DM-β-CD 之间配位包结的 ROESY 二维谱图。从 ROESY 谱图中可以看出, DM-β-CD 空腔内部的 H-3 和 H-5 质子与漆黄素中 B 环部分的 H-6、7、8 位质子有 NOE 相关 (相关峰 B 及其放大图); 与漆黄素的 A 环 H-1 质子有关键的 NOE 相关。B 相关点表明, 漆黄素分子的 B 环和 A 环部分进入了 DM-β-CD 空腔内。

图 6-c 显示了漆黄素与 SBE-β-CD 之间配位包结的 ROESY 二维谱图。从 FIT/SBE-β-CD 包合物的 ROESY 谱图中可以看出, SBE-β-CD 空腔内部的 H-3 和 H-5 质子与漆黄素中 B 环部分的 H-6、7、8 位质子有 NOE 相关 (相关峰 C 及其放大图); 与漆

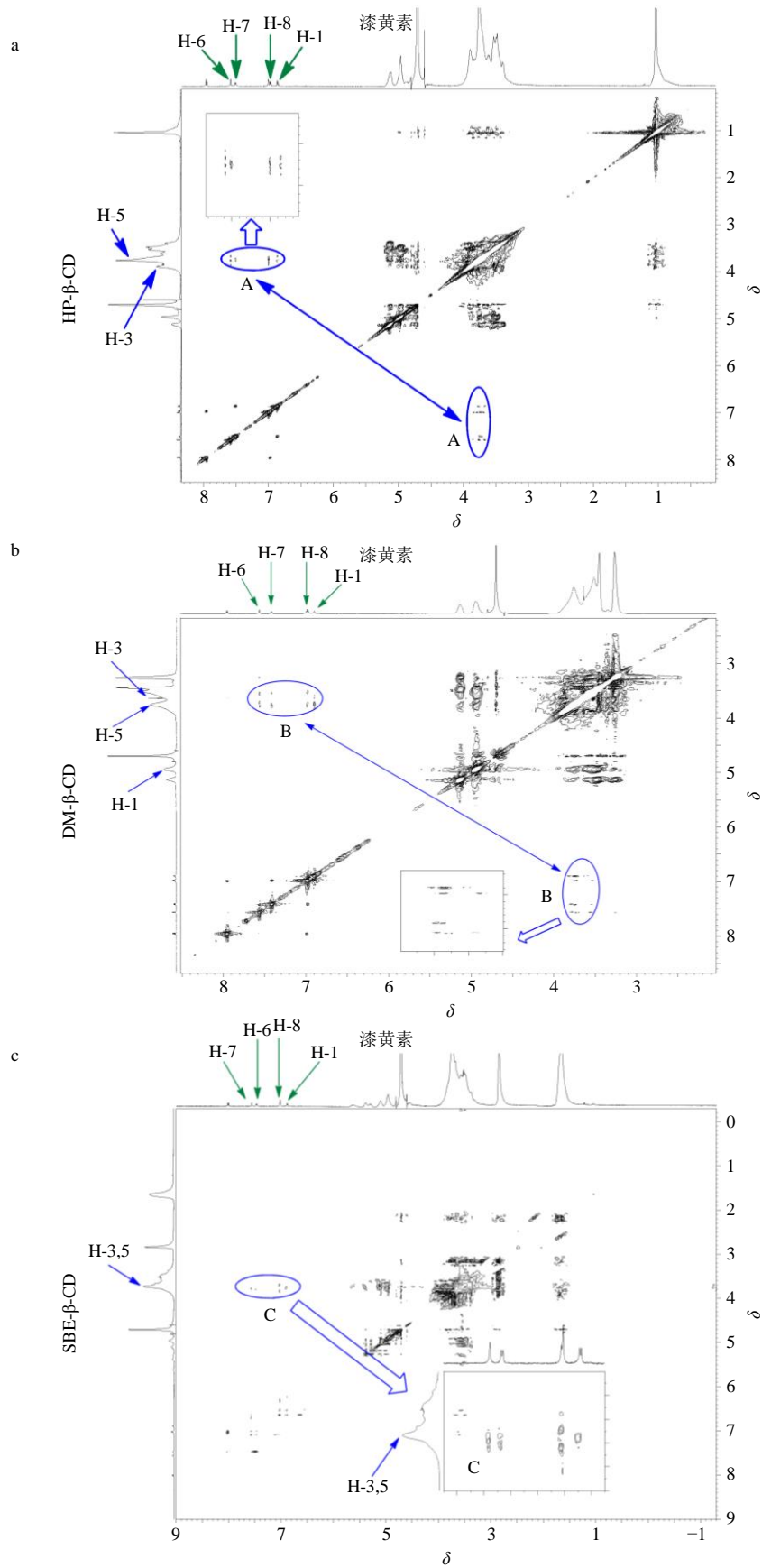


图 6 FIT/HP-β-CD (a)、FIT/DM-β-CD (b)、FIT/SBE-β-CD (c) 包合物的 ROESY 谱图  
Fig. 6 ROESY spectrum of FIT/HP-β-CD (a), FIT/DM-β-CD (b), FIT/SBE-β-CD (c) complex



黄素的 A 环 H-1 质子有关键的 NOE 相关。C 相关点表明，漆黄素分子的 B 环和 A 环部分进入了 SBE-β-CD 空腔内。

综上所述的核磁共振 (<sup>1</sup>H-NMR 与 <sup>2</sup>D-NMR) 分析，及主体-客体之间以 1 : 1 化学计量配位包含，可推测出 β-CD 及其衍生物 (HP-β-CD、DM-β-CD 和 SBE-β-CD) 与漆黄素可能的包结模式如图 7 所示。另外，从药物的结构分析包含模式，因漆黄素结构较独特，B 环上具有邻二酚羟基，与环糊精配位包含时，易与环糊精空腔内的 H 质子形成氢键，促进包合物的形成，即药物由 B 环结构先进入环糊精空腔。

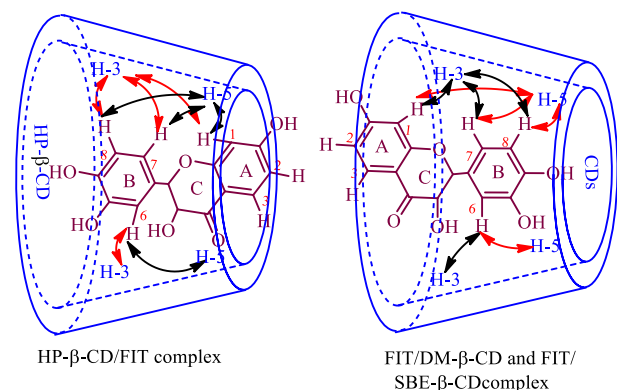
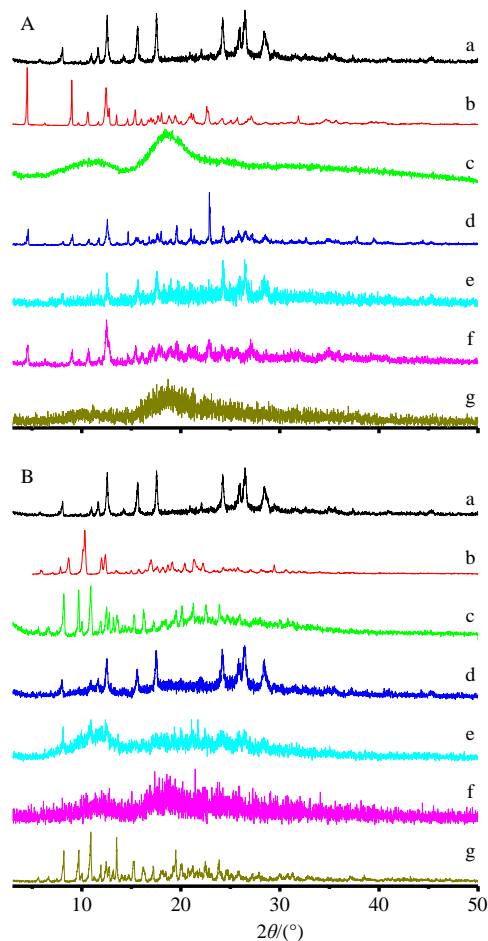


图 7 FIT/CDs 包合物的可能包结模式与关键的 NOESY (↔) 相关

Fig. 7 Possible inclusion modes of FIT/CDs inclusion complexes related to key NOESY (↔)

**3.3.4 X 射线粉末衍射 (XRD) 分析** XRD 分析是根据超分子体系的主客体包含后，包合物与原主客体的晶型结构存在明显的差异，来判断包合物是否形成<sup>[28]</sup>。如图 8-A 所示，漆黄素 (a)、β-CD (b) 具有明显的晶形特征，而 HP-β-CD (c) 为无定形，它们的物理混合物 (e) 包含了药物漆黄素和环糊精的特征衍射峰，配位包合物 FIT/β-CD、FIT/HP-β-CD 的粉末 X 射线衍射 (f 和 g) 显示了晕模式，与晶态的漆黄素、β-CD 或无定形的 HP-β-CD 的简单叠加截然不同，衍射峰强度较漆黄素而言显著地减弱，说明了 β-CD 或 HP-β-CD 和漆黄素形成包合物。进而，包合物 FIT/β-CD、FIT/HP-β-CD 的衍射峰上漆黄素的特征峰消失，呈现小部分环糊精的特征峰型，这可能是漆黄素与环糊精形成包合物时，漆黄素的分子量较小，包合物表面发生一定程度的变化。

如图 8-B 所示，漆黄素 (a)、DM-β-CD (b)、SBE-β-CD (c) 具有明显的晶形特征，它们的物理



A-β-CD、HP-β-CD 体系 B-DM-β-CD、SBE-β-CD 体系 a-漆黄素 b、c-不同环糊精 d、e-不同体系的物理混合物 f、g-不同体系的包合物

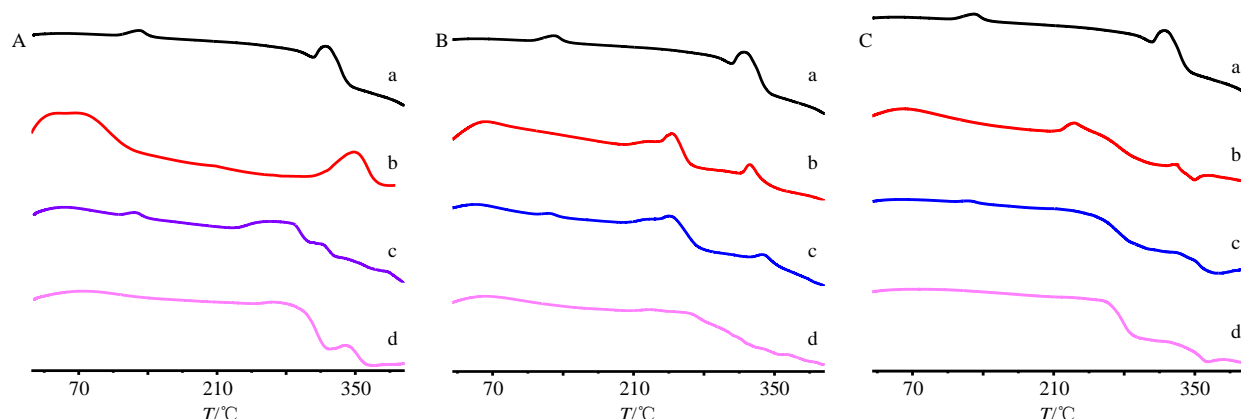
A-β-CD, HP-β-CD system B-DM-β-CD, SBE-β-CD system a-fisetin b, c-different β-CDs d, e-different physical mixture systems f, g-different inclusion complex systems

图 8 XRD 图

Fig. 8 XRD patterns

混合物 (d、e) 为药物漆黄素和环糊精的简单叠加，配位包合物 FIT/DM-β-CD 的粉末 X 射线衍射 (f) 显示了晕模式，与晶态的漆黄素、DM-β-CD 的简单叠加的衍射峰大相径庭，强度较漆黄素显著地减弱，包合物 FIT/SBE-β-CD 的粉末 X 射线衍射 (g) 具有明显的晶形特征，其特征峰与各自的包合物明显不同，说明 DM-β-CD 或 SBE-β-CD 和漆黄素形成了包合物。

**3.3.5 热量分析** DSC 法可研究 FIT/HP-β-CD、FIT/DM-β-CD 及 FIT/SBE-β-CD 配位包合物的热量性质。如图 9-A 所示，漆黄素的 DSC 谱图曲线 (a) 在 130.9、307.6 °C 处存在较弱的放热峰，这是药物漆黄素融化的吸热峰。HP-β-CD 的 DSC (b) 上 69、



A-HP-β-CD 体系 B-DM-β-CD 体系 C-SBE-β-CD 体系 a-漆黄素 b-不同环糊精 c-不同体系的物理混合物 d-不同体系的包合物  
 A-HP-β-CD system B-DM-β-CD system C-SBE-β-CD system D-TM-β-CD system a-fisetin b-different β-CDs c-different physical mixture systems d-different inclusion complex systems

图 9 DSC 法分析曲线

Fig. 9 DSC analysis curve

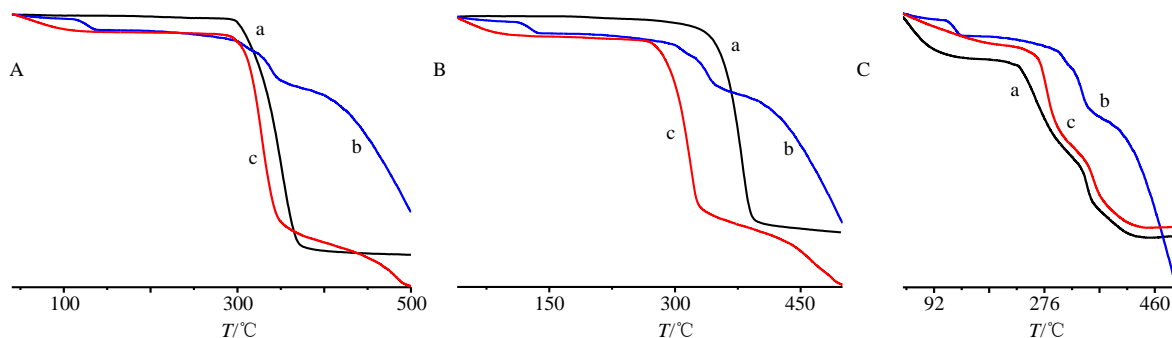
355 °C 处存在较宽的放热峰，前者是脱水所致。物理混合的 DSC 谱图为两者的叠加，而包合物的 DSC (d) 中药物漆黄素的主峰消失，355 °C 处的 HP-β-CD 峰减弱，在 324.3、369.7 °C 处出现吸热峰，这可能是包合物融化吸热与 HP-β-CD 分解放热所致。

同样，在 FIT/DM-β-CD (B) 和 FIT/SBE-β-CD (C) 包合物的 DSC 谱图曲线中，漆黄素在 130.9、307.6 °C 处的放热峰消失了，分别出现了 315.8 (FIT/DM-β-CD)、323、363 °C (FIT/SBE-β-CD) 新的吸热峰。以上热量分析 (DSC) 的结果，进一步验证漆黄素与环糊精之间形成了配位包合物。

**3.3.6 TG** FIT/HP-β-CD、FIT/DM-β-CD 和 FIT/SBE-β-CD 包合物的热量性质可通过 TG 分析方法进一步进行研究。如图 10 所示，漆黄素在 121.9 °C 左右分解，HP-β-CD 大约在 329 °C 左右融化，DM-β-CD 大约在 248 °C 左右融化；然而，它们的

包合物显示出不同的热稳定性，FIT/HP-β-CD 和 FIT/DM-β-CD 包合物分别在 311、296 °C 左右分解。同样可以看出 FIT/SBE-β-CD 包合物在 267 °C 左右分解。从图中可以看出药物漆黄素在 300 °C 以后，质量随着温度的升高呈直线下降，而包合物形成后随着温度的变化质量缓慢减少。从 TG 实验可以看出，漆黄素与环糊精所形成的 3 种配位包合物 (FIT/HP-β-CD、FIT/DM-β-CD 和 FIT/SBE-β-CD) 的分解温度均高于 200 °C，从热量 DSC 角度分析，形成的包合物有良好的热稳定性。

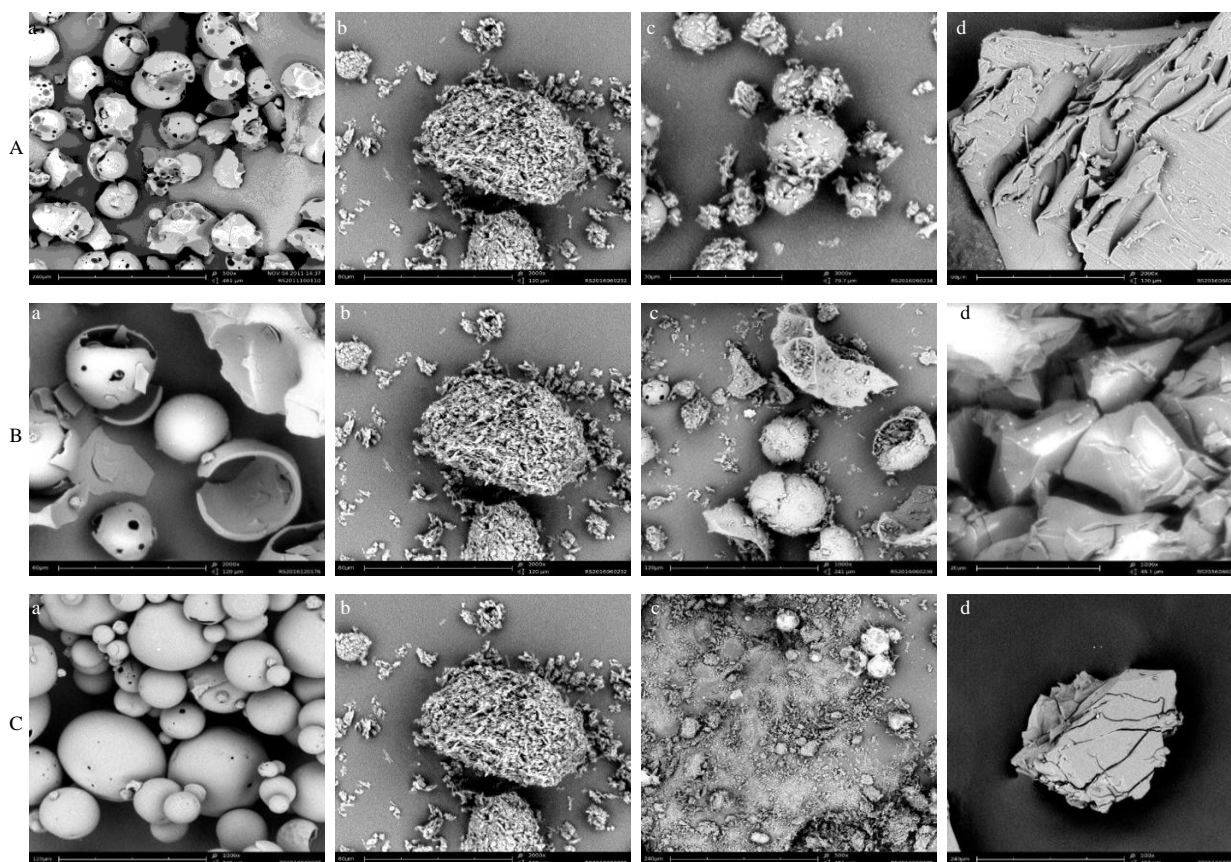
**3.3.7 SEM 分析** SEM 可对药物、包合物及原环糊精表面结构进行定性分析<sup>[29]</sup>，是分析包合物是否形成的重要方法。如图 11 所示，HP-β-CD 的结构为有空腔的球状晶体，似骷髅状 (a)，漆黄素结构为无定型的絮状包裹物 (b)，FIT/HP-β-CD 的 1:1 物理混合物显现漆黄素附着于 HP-β-CD 的球状表



A-HP-β-CD 体系 B-DM-β-CD 体系 C-SBE-β-CD 体系 a-不同环糊精 b-漆黄素 c-不同体系的包合物  
 A-HP-β-CD system B-DM-β-CD system C-SBE-β-CD system a-different CDs b-fisetin c-different inclusion complex systems

图 10 TG 分析曲线

Fig. 10 TG analysis curve



A-HP-β-CD体系 B-DM-β-CD体系 C-SBE-β-CD体系 a-不同环糊精 b-漆黄素 c-不同体系的物理混合物 d-不同体系的包合物  
A-HP-β-CD system B-DM-β-CD system C-SBE-β-CD system a-different CDs b- FIT c-different physical mixture systems  
d-different inclusion complex systems

图 11 漆黄素与环糊精包合物体系的 SEM 图

Fig. 11 SEM micrographs of fisetin with CDs inclusion complex system

面，两者简单的堆积 (c)，而形成包合物后表面结构截然不同，呈现出块状体，较 HP-β-CD、漆黄素的表面结构发生了明显的变化，进一步说明 FIT/HP-β-CD 包合物形成。同样的，DM-β-CD、SBE-β-CD 与漆黄素形成包合物后表面结构发生较大变化，进一步说明漆黄素与和 β-环糊精衍生物均形成了包合物。

**3.3.8 包合率的测定**<sup>[30-31]</sup> 采用饱和溶液法准确称取 10 mg 的 FIT/HP-β-CD、FIT/DM-β-CD 及 FIT/SBE-β-CD 包合物分别于真空减压干燥 (温度 60 °C)，加入 2 mL 蒸馏水，搅拌 15 min，用 0.45 μm 滤膜过滤，取少许滤液稀释，摇匀于 363 nm 波长下测定 A 值，代入回归方程算出客体药物的含量，计算出包合物 FIT/HP-β-CD、FIT/DM-β-CD 及 FIT/SBE-β-CD 的包合物得率和包合率。

包合率 = 包合物中客体药物质量 / 包合物质量

包合物得率 = 包合物质量 / 实际药物质量

经测定，FIT/HP-β-CD 的平均包合率为 3.99%，包合物得率为 82.23%；FIT/DM-β-CD 的平均包合率为 4.19%，包合物得率为 71.58%；FIT/SBE-β-CD 包合物的平均包合率为 2.20%，包合物得率为 80%。实验结果讨论：包合物 FIT/HP-β-CD、FIT/DM-β-CD 及 FIT/SBE-β-CD 的包合物得率较低，可能是环糊精质量分子大，测量仪器和操作存在误差，也有可能是测量包合率时所用的溶剂为蒸馏水，而标准曲线中所用的是纯乙醇，会引起一定的误差。

**3.3.9 水溶性实验** 本研究通过饱和溶液法<sup>[32-33]</sup>测定漆黄素与环糊精的配位包合物的溶解度。结果显示，与药物漆黄素较差的水溶性 (50 μg/mL) 相比，漆黄素的水溶性分别被 HP-β-CD、DM-β-CD 和 SBE-β-CD 配位包合后，明显地提高到了约 3.45、3.70、4.60 mg/mL (以漆黄素计)。结果显示，漆黄素与 β-CD 衍生物配位包合物具有较好的水溶性。这一研究将有助于研制含有漆黄素分子的高水溶性

生物农药或医药分子。

**3.3.10 模拟生物环境下的稳定性实验** 通过测定药物漆黄素及其包合物 FIT/ $\beta$ -CD、FIT/HP- $\beta$ -CD、FIT/DM- $\beta$ -CD、FIT/SBE- $\beta$ -CD 在 pH 1.5 (模拟胃液) 和 pH 7.6 (模拟肠液) [34-35] 环境下的  $A$  值, 观察包合物在生物体里的稳定性。如图 12 所示, 当 pH 1.5 时, 在 12 h 内 FIT/ $\beta$ -CD 和 FIT/HP- $\beta$ -CD 包合物较空白漆黄素相对吸光度 [ $A/A_0$ ,  $A$  为每 (12 $\pm$ 2) h 内所测吸光度,  $A_0$  为原始吸光度] 降低了 1.94%, 36 h 后空白漆黄素较 FIT/ $\beta$ -CD 和 FIT/HP- $\beta$ -CD 包合物  $A/A_0$  降低了 0.8%, 以较快的速度在下降。96 h 后 FIT/ $\beta$ -CD 和 FIT/HP- $\beta$ -CD 包合物的  $A/A_0$  降低速度慢, 趋于平缓。当 pH 7.6 时, 24 h 内降低 3.4%, 36~60 h, FIT/ $\beta$ -CD 包合物较空白漆黄素在降低了 4.2%, 36 h 后空白漆黄素以较快的速度下降。

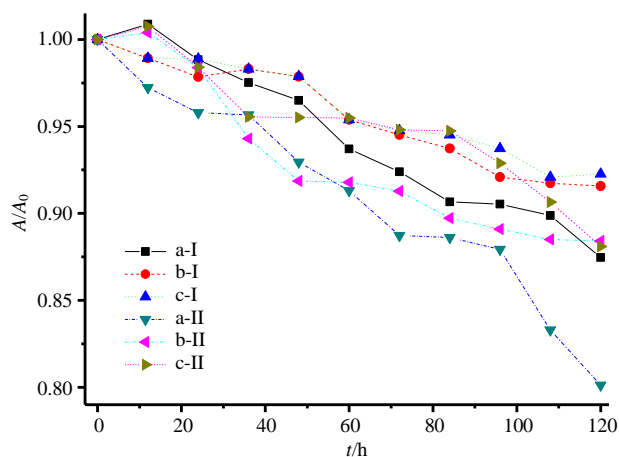


图 12 漆黄素 (a)、FIT/ $\beta$ -CD 包合物 (b)、FIT/HP- $\beta$ -CD 包合物 (c) 在 pH 1.5 (I) 和 pH 7.6 (II) 时的相对吸光度 ( $A/A_0$ ) 随时间变化的曲线图

Fig. 12 Relative values ( $A/A_0$ ) of fisetin (a), FIT/ $\beta$ -CD complex (b), FIT/HP- $\beta$ -CD complex (c) at pH 1.5 (I) and pH 7.6 (II)

如图 13 所示, 对于 FIT/DM- $\beta$ -CD 和 FIT/SBE- $\beta$ -CD 包合物在 pH 1.5 时, 在 36 h 内 FIT/DM- $\beta$ -CD 和 FIT/SBE- $\beta$ -CD 包合物较空白漆黄素  $A/A_0$  降低速度慢, 36 h 后空白漆黄素较 FIT/DM- $\beta$ -CD 包合物  $A/A_0$  降低了 1.9%, 较 FIT/SBE- $\beta$ -CD 缓慢降低。96 h 后 FIT/DM- $\beta$ -CD 和 FIT/SBE- $\beta$ -CD 包合物的  $A/A_0$  趋于平缓。当 pH 7.6 时, 24~60 h 内 FIT/DM- $\beta$ -CD 较空白漆黄素  $A/A_0$  降低了 2.6%, 60 h 后, FIT/DM- $\beta$ -CD 包合物较空白漆黄素在降低速度较慢, 后趋于平缓。包合物在 pH 1.5 (模拟胃液) 较 pH 7.6 (模拟肠液) 的环境下  $A/A_0$  降低速度慢, 这说明药物漆

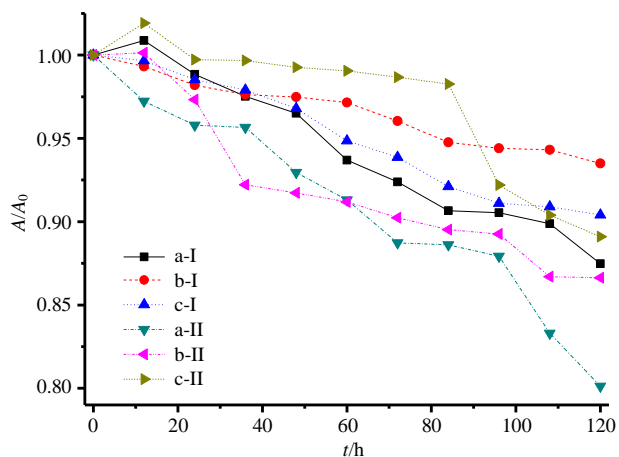


图 13 漆黄素 (a)、FIT/DM- $\beta$ -CD 包合物 (b)、FIT/SBE- $\beta$ -CD 包合物 (c) 在 pH 1.5 (I) 和 pH 7.6 (II) 的  $A/A_0$  随时间变化的曲线图

Fig. 13  $A/A_0$  of fisetin (a), FIT/DM- $\beta$ -CD complex (b), FIT/SBE- $\beta$ -CD complex (c) at pH 1.5 (I) and pH 7.6 (II)

黄素及其包合物在酸性条件下较为稳定, 这可能与药物漆黄素在溶液中所存在的分子型体有关。

### 3 讨论

本研究采用超声法制备了 FIT/HP- $\beta$ -CD 及 FIT/DM- $\beta$ -CD、FIT/SBE- $\beta$ -CD 包合物, 并进行了表征, 研究了黄酮类药物漆黄素与  $\beta$ -环糊精衍生物的配位包合行为、包合模式、水溶性及稳定性。结果显示, 漆黄素在酸性条件下  $K_s$  值较大, 漆黄素与  $\beta$ -环糊精衍生物 (HP- $\beta$ -CD、DM- $\beta$ -CD、SBE- $\beta$ -CD) 的包合比均为 1:1, 形成包合物后, 其水溶性、热稳定性及生物环境稳定性都得到明显提高。在本研究中, 考虑到药物漆黄素的低水溶性使其在应用上受限, 采用具有独特性质的  $\beta$ -环糊精衍生物作载体与药物漆黄素配位包合, 这一研究将为漆黄素药物在医药临床研究提供新的思路。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] Prasath G S, Subramanian S P. Fisetin, a tetra hydroxy flavone recuperates antioxidant status and protects hepatocellular ultrastructure from hyperglycemia mediated oxidative stress in streptozotocin induced experimental diabetes in rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 59(3): 249-255.
- [2] Lin J, Nie X, Xiong Y, et al. Fisetin regulates gut microbiota to decrease CCR9<sup>+</sup>/CXCR3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte count and IL-12 secretion to alleviate premature ovarian failure in mice [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(1): 203-247.

- [3] Lu H, Chang D J, Baratte B, *et al.* Crystal structure of a human cyclin-dependent kinase 6 complex with a flavonol inhibitor, fisetin [J]. *J Med Chem*, 2005, 48(3): 737-743.
- [4] Lee J W, Choi H J, Kim E J, *et al.* Fisetin induces apoptosis in uterine leiomyomas through multiple pathways [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 7993.
- [5] Touil Y S, Auzeil N, F Boulinguez, *et al.* Fisetin disposition and metabolism in mice: Identification of geraldol as an active metabolite [J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 82(11): 1731-1739.
- [6] Hosny M, Dhar K, Rosazza J. Hydroxylations and methylations of quercetin, fisetin, and catechin by *Streptomyces griseus* [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64(4): 462-465.
- [7] Kubina R, Iriti M, Kabaa-Dzik A. Anticancer potential of selected flavonols: Fisetin, kaempferol, and quercetin on head and neck cancers [J]. *Nutrients*, 2021, 13(3): 845.
- [8] Xu M X, Sun Y, Dai X L, *et al.* Fisetin attenuates high fat diet-triggered hepatic lipid accumulation: A mechanism involving liver inflammation overload associated TACE/TNF- $\alpha$  pathway [J]. *J Funct Foods*, 2019, 53: 7-21.
- [9] Jang K Y, Jeong S J, Kim S H, *et al.* Activation of reactive oxygen species/AMP activated protein kinase signaling mediates fisetin-induced apoptosis in multiple myeloma U266 cells [J]. *Cancer Lett*, 2012, 319(2): 197-202.
- [10] Touil Y S, Seguin J, Scherman D, *et al.* Improved antiangiogenic and antitumour activity of the combination of the natural flavonoid fisetin and cyclophosphamide in Lewis lung carcinoma-bearing mice [J]. *Cancer Chemother Pharm*, 2011, 68(2): 445-455.
- [11] Altamimi J Z, Binmowyna M N, Alfaris N A, *et al.* Fisetin protects against streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in rats by suppressing fatty acid oxidation and inhibiting protein kinase R [J]. *Saudi Pharm J*, 2020, 29(1): 27-42.
- [12] Adhami V M, Syed D N, Khan N, *et al.* Dietary flavonoid fisetin: A novel dual inhibitor of PI3K/Akt and mTOR for prostate cancer management [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84(10): 1277-1281.
- [13] Lee J W, Choi H J, Kim E J, *et al.* Fisetin induces apoptosis in uterine leiomyomas through multiple pathways [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 7993.
- [14] Maher P, Akaishi T, Abe K. Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(44): 16568-16573.
- [15] Sung B, Pandey M K, Aggarwal B B. Fisetin, an inhibitor of cyclin-dependent kinase 6, down-regulates nuclear factor-kappaB-regulated cell proliferation, antiapoptotic and metastatic gene products through the suppression of TAK-1 and receptor-interacting protein-regulated I $\kappa$ B kinase activation [J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 71(6): 1703-1714.
- [16] Rengarajan T, Yaacob N S. The flavonoid fisetin as an anticancer agent targeting the growth signaling pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 789: 8-16.
- [17] Shia C S, Tsai S Y, Kuo S C, *et al.* Metabolism and pharmacokinetics of 3,3',4',7-tetrahydroxyflavone (fisetin), 5-hydroxyflavone, and 7-hydroxyflavone and antihemolysis effects of fisetin and its serum metabolites [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(1): 83-89.
- [18] Yang L J, Chang Q, Zhou S Y, *et al.* Host-guest interaction between brazilin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Preparation, inclusion mode, molecular modelling and characterization [J]. *Dyes & Pigments*, 2018, 150: 193-201.
- [19] 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]. *Mat Sci Eng C-Mater*, 2016, 59: 1016-1024.
- [20] Renny J S, Tomasevich L L, Tallmudge E H, *et al.* Method of continuous variations: Applications of Job plots to the study of molecular associations in organometallic chemistry [J]. *Angew Chem Int Edit*, 2013, 52(46): 11998-12013.
- [21] Yang Z P, Zhang K, Gong F B, *et al.* A highly selective fluorescent sensor for fluoride anion based on pyrazole derivative: Naked eye "no-yes" detection [J]. *J Photochem Photobiol A*, 2011, 217(1): 29-34.
- [22] 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.
- [23] 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]. *Mat Sci Eng C-Mater*, 2017, 76: 1136-1145.
- [24] 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.
- [25] Inoue Y, Yamamoto K, Wada T, *et al.* Inclusion complexation of (cyclo)alkanes and (cyclo)alkanols with 6-O-modified cyclodextrins [J]. *J Chem*, 1998(8):

- 1807-1816.
- [26] Slabbert N P. Ionisation of some flavanols and dihydroflavonols [J]. *Tetrahedron*, 1977, 33(7): 821-824.
- [27] Correia I, Bezzenine N, Ronzani N, *et al.* Study of inclusion complexes of acridine with  $\beta$ - and (2,6-di-*O*-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin by use of solubility diagrams and NMR spectroscopy [J]. *J Phys Org Chem*, 2002, 15(9): 647-659.
- [28] Scalia S, Molinari A, Ca Solari A, *et al.* Complexation of the sunscreen agent, phenylbenzimidazole sulphonic acid with cyclodextrins: Effect on stability and photo-induced free radical formation [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2004, 22(4): 241-249.
- [29] Araujo D, Tsuneda S S, Cereda C, *et al.* Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2008, 33(1): 60-71.
- [30] 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.
- [31] 曹正雨, 胡正明, 陈建明. 正交法优选替硝唑-羟丙基- $\beta$ -环糊精包合工艺 [J]. *中国医院药学杂志*, 2004, 24(9): 521-522.
- [32] Montassier P, Duchêne D, Poelman M C. Inclusion complexes of tretinoin with cyclodextrins [J]. *Int J Pharmaceut*, 1997, 153(2): 199-209.
- [33] 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.
- [34] 马原野. 从脾胃升降理论拓展根除幽门螺杆菌的临床思路 [J]. *华人消化杂志*, 1998(S2): 431-432.
- [35] 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.

[责任编辑 郑礼胜]