

• 药剂与工艺 •

芫花素与水溶性磷酸盐柱[6]芳烃包合物的制备、表征及分子模拟研究

陶 欣, 杨云汉, 杨明坤, 张郡童, 陈 艳, 杨 举, 杨玉香, 钊永明*, 杨丽娟*

云南民族大学化学与环境学院 云南省高校智能超分子化学重点实验室 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

摘 要: **目的** 以水溶性磷酸盐柱[6]芳烃(phosphate salt pillar[6]arene, PP6A)作为芫花素的药物载体即主体分子, 天然芫花素为客体分子, 构筑了一种新型的芫花素/PP6A(genkwanin/PP6A, GK/PP6A)超分子主客体包合物, 对其进行表征和性能分析, 进一步对包合机制进行研究。**方法** 采用饱和水溶液法制备芫花素与 PP6A 的超分子包合物; 以包合物的包合率为指标, 选用物质的量比、包合温度、包合时间和甲醇与水的体积比 4 个因素, 每个因素 3 个水平, 以 $L_9(3^4)$ 设计正交试验, 对 GK/PP6A 包合物的制备工艺进行优化筛选。采用紫外可见吸收光谱法、傅里叶变换红外光谱、X 射线粉末衍射、扫描电子显微镜和差示扫描量热等分析方法对芫花素和 PP6A 包合前后的理化性质进行研究分析; 通过半经验分子轨道法、分子对接和核磁共振波谱法揭示了芫花素与 PP6A 最稳定的包合模式。**结果** GK/PP6A 包合物的最优制备工艺为 PP6A 与芫花素的物质的量比为 1:1, 包合温度为 50 °C, 包合时间 8 h, 甲醇与超纯水体积比为 1:8, GK/PP6A 包合物的包合率为 89.93%; 芫花素和 PP6A 以物质的量比 1:1 形成超分子包合物, 其络合常数为 49 488 L/mol; 半经验分子轨道法与分子对接揭示的包合机制与二维核磁共振氢谱推断的主客体可能的包合模式相互吻合; 芫花素包合前后的水溶解性和稳定性显著提高, 其中水溶解性由 3.5 $\mu\text{g/mL}$ 提升至 540.5 $\mu\text{g/mL}$, 约提高了 155 倍。**结论** PP6A 是芫花素的良好宿主, 芫花素与 PP6A 形成包合物后, 芫花素的水溶性和稳定性得到显著提高, 疏水作用和氢键作用为包合物形成的主要驱动力。

关键词: 芫花素; 水溶性磷酸盐柱[6]芳烃; 包合物; 分子对接; 溶解度

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)01-0057-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.01.008

Preparation, characterization and molecular modeling studies of inclusion complex of genkwanin with water-soluble phosphate salt pillar[6]arene

TAO Xin, YANG Yunhan, YANG Mingkun, ZHANG Juntong, CHENG Yan, YANG Ju, YANG Yuxiang, CHUAN Yongming, YANG Lijuan

Key Laboratory of Intelligent Supramolecular Chemistry at University of Yunnan Province, National and Local Joint Engineering Research Center for Green Preparation Technology of Biobased Materials, School of Chemistry & Environment, Yunnan Minzu University, Kunming 650500, China

Abstract: Objective A novel supramolecular host-guest inclusion complex of genkwanin/phosphate salt pillar[6]arene (GK/PP6A) was constructed with water-soluble phosphate salt pillar[6]arene (PP6A) as the drug carrier (as the host) and the natural medicine genkwanin (GK) as the guest molecule. The characterization and performance analysis were carried out, and the formation mechanism of inclusion complex was studied. **Methods** The inclusion complex of GK/PP6A was prepared by saturated solution, the preparation process of GK/PP6A inclusion compound was optimized and screened. The orthogonal experiment was designed with $L_9(3^4)$, using four factors, including molar ratio, inclusion temperature, inclusion time and volume ratio of methanol to water, with three levels for

收稿日期: 2023-06-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21762051); 云南省兴滇英才支持计划(教学名师专项); 云南省高校科技创新团队项目; 云南省教育厅科学研究基金项目(2023Y0519); 研究生基金资助项目(2022SKY031)

作者简介: 陶 欣(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为超分子化学。E-mail: taoxin0627@163.com

***通信作者:** 钊永明(1983—), 男, 硕士生导师, 讲师, 研究方向为有机合成。E-mail: chuan5211017@126.com

杨丽娟(1971—), 女, 白族, 硕士生导师, 教授, 研究方向为超分子药物化学。Tel: (0871)65910017 E-mail: yanglijiang@sina.com

each factor. The physico-chemical properties of genkwanin and PP6A before and after inclusion were studied by ultraviolet-visible spectroscopy, infrared spectroscopy, X-ray powder diffraction, scanning electron microscope and differential scanning calorimeter, and the most stable inclusion modes of genkwanin and PP6A were revealed by semi-empirical molecular orbital method, molecular docking and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Results** The optimal preparation process of GK/PP6A inclusion complex was that the molar ratio of PP6A to genkwanin is 1 : 1, 50 °C for the temperature, 8 h for the time, and 1 : 8 for the volume ratio of ethanol to water, the inclusion rate of GK/PP6A inclusion complex was 89.93%. The experimental results showed that genkwanin and PP6A form supramolecular inclusion complex with a molar ratio of 1 : 1, and the inclusion complex constant was calculated to be 49 488 L/mol. The inclusion mechanism revealed by semi-empirical molecular orbital method and molecular docking was in agreement with the possible inclusion model of host and guest inferred by two-dimensional hydrogen magnetic resonance spectroscopy. The stability and water solubility of genkwanin before and after inclusion complex were significantly improved, and the water solubility was increased from 3.5 µg/mL to 540.5 µg/mL, about 155 times. **Conclusion** PP6A is a good host of genkwanin. The water solubility and stability of genkwanin were significantly improved after genkwanin formed inclusion complex with PP6A. Hydrophobicity and hydrogen bonding are the main driving forces for inclusion complex formation.

Key words: genkwanin; water-soluble phosphate salt pillar[6]arene; inclusion complex; molecule docking; solubility

芫花素又称为 5,4'-二羟基-7-甲氧基黄酮, 是一种从瑞香科瑞香属植物芫花, 唇形科植物刺楸苏、迷迭香和月桂叶、黑桤木、沉香树等众多植物中分离出来的典型的非糖基化类黄酮类化合物^[1-3], 具有较高的生物活性和低毒性等特点^[4]。芫花素具有抗菌^[5]、抗炎^[6]、抗氧化^[7]、抗肿瘤^[8-9]、抗疟原虫^[10]、自由基清除^[11]、免疫调节^[4]和抗神经退行性疾病^[12]等多种生物药理学作用, 近年来被广泛应用于临床上新型药物制剂的研究。但因其性状不稳定, 易吸水潮解霉变, 需在低温条件下密封干燥保存, 溶解性较差^[13]。因此亟需找到一种高效低毒的药物载体以改善芫花素在药物制剂研发中受到的限制。

大环化学发展了冠醚^[14]、环糊精^[15]、杯芳烃^[16]、葫芦脲^[17]和柱芳烃^[18]等 5 类经典的大环主体化合物, 推动了超分子化学的快速发展。其中柱芳烃作为第 5 代大环分子, 具有独特的刚性富电子空腔、易于修饰、主客体亲和力强和优异的生物兼容性等特点, 使其成为构筑功能有机超分子体系的有利载体^[19]。与其他几类经典的大环主体化合物相比, 柱芳烃因具有优异的生物兼容性和水溶性^[20], 被广泛应用于生物医药^[21]、功能材料^[22]、高效催化剂^[23]和环境污染治理^[24]等领域, 且成为继环糊精之后一种新型且高效低毒的天然药物载体, 能有效改善药物分子的理化性质^[25]。

本研究选用水溶性磷酸盐柱[6]芳烃 (phosphate salt pillar[6]arene, PP6A) 作为药物载体, 芫花素为客体分子, 采用饱和水溶液法制备芫花素和 PP6A 的超分子包合物 (GK/PP6A), 通过紫外-可见吸收光谱法 (UV-Vis)、半经验分子轨道法、分子对接、核磁共振波谱 (¹H-NMR、2D-NMR)、傅里叶变换

红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)、X 射线粉末衍射 (X-ray powder diffraction, XRD)、扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 和差示扫描量热 (differential scanning calorimetry, DSC) 等分析方法对芫花素包合前后的理化性质进行研究分析, 并推测了主客体可能的包合模式。进一步以包合物的包合率为指标, 对 GK/PP6A 包合物的制备工艺进行了优化筛选。

1 仪器与试剂

Nova Nanosem-450 型扫描电子显微镜, 美国 FEI 公司; Bruker D8 Advance A25X 型 X 射线粉末衍射仪、Bruker Avance 400 型核磁共振仪, 瑞士 Bruker 公司; UV-2600i 型紫外分光光度计, 日本岛津仪器有限公司; Nicolet IS10 型傅里叶红外光谱仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; STA 449F3 型差示扫描量热仪, 德国 Netzsch 公司; S22-2 型恒温磁力搅拌器, 上海司乐仪器有限公司; N-1100D-WD 型旋转蒸发器, 云南科仪化玻有限公司; SHZ-(D)III 型循环水式真空泵, 巩义市英峪予华仪器厂; FA1004 型电子分析天平, 上海天平仪器厂; DZF 型真空干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司。

三苯基膦 (质量分数 99.0%, 批号 P1475928)、三甲基溴硅烷 (质量分数 98.0%, 批号 P1348856)、亚磷酸三乙酯 (质量分数 98.0%, 批号 P1656460) 购于阿拉丁试剂有限公司; 四溴化碳 (质量分数 97.0%, 批号 P1412529)、1,4-二(2-羟基乙氧基) (质量分数 95.0%, 批号 F1220202)、多聚甲醛 (质量分数 96.0%, 批号 P1322770)、KBr (质量分数 99.99%, 批号 20200401) 购于泰坦科技有限公司; 三氟化硼乙醚 (质量分数 46.5%, 批号 9LWDR4VQ) 购于安

耐吉化学有限公司；氨水（体积分数 25.0%，批号 2022041326）购于天津市致远化学试剂有限公司；芫花素（质量分数 98.0%，批号 HR1168W9）购于陕西辰光生物科技有限公司；氯仿（体积分数 99.0%，批号 20220301）、丙酮（体积分数 99.5%，批号 20220301）购于重庆川东化工有限公司。

2 方法与结果

2.1 PP6A 的合成及其溶解度研究

2.1.1 PP6A 的合成 参照文献方法^[26]合成 PP6A，合成路线如图 1 所示，产率 98.20%。谱图数据与文

献报道一致，¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ: 6.95 (12H, s), 4.09 (24H, s), 3.84 (12H, s), 2.13 (24H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ: 150.1, 128.8, 116.8, 65.4, 29.3, 28.3。

2.1.2 PP6A 的溶解度研究 用超纯水配制系列质量浓度梯度的 PP6A 溶液，并在最大吸收波长 (λ=340 nm) 处测定其紫外吸收光谱，以 PP6A 吸光度 (A) 对其质量浓度 (C) 作图，得线性回归方程 $A = 18.511\,43\,C - 0.000\,641$, $r = 0.999\,5$, 结果表明 PP6A 在 5.991 3~60.137 9 mg/L 线性关系良好。

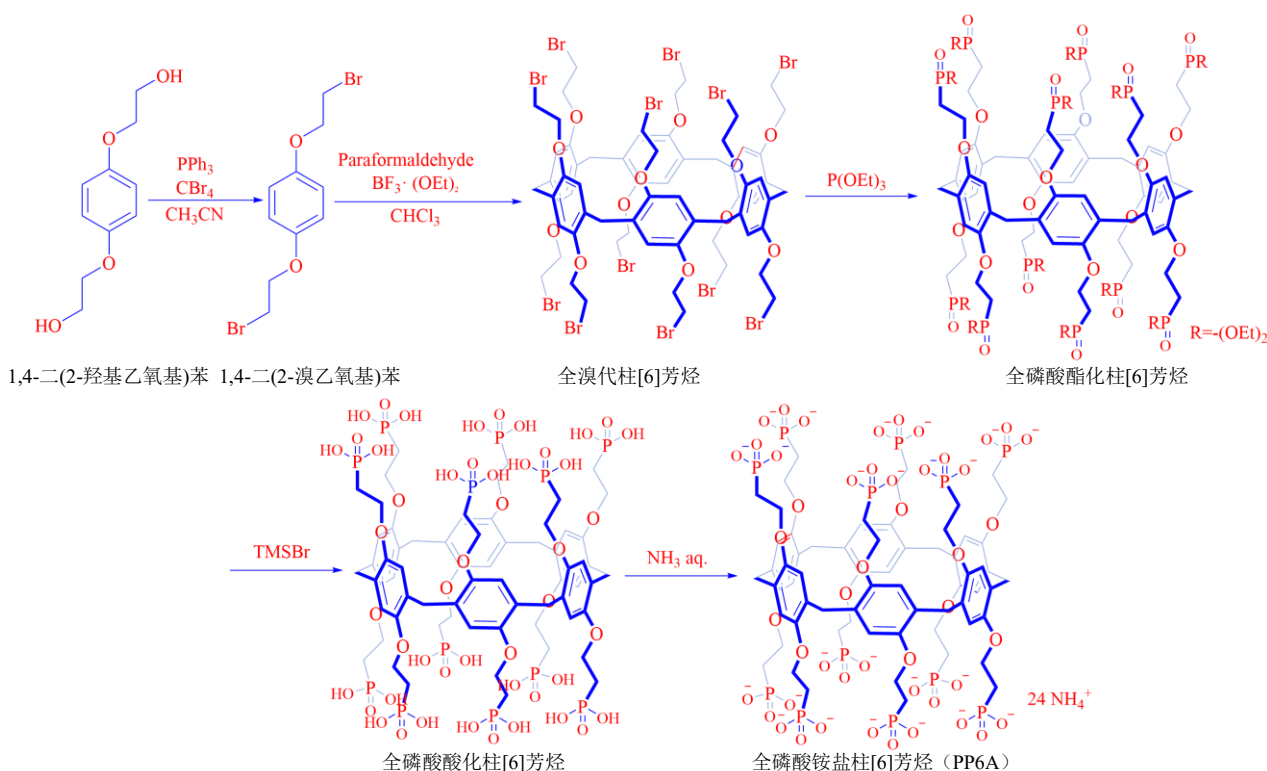


图 1 PP6A 的合成路线图

Fig. 1 Synthesis route of PP6A

通过饱和溶液法探究了不同温度下 PP6A 的溶解度，分别在 25、30、40、50 °C 的温度下制备 PP6A 的饱和水溶液，并通过 PP6A 的紫外吸收标准曲线计算出 PP6A 在不同温度下的溶解度，如表 1 所示。由实验结果可知，随着温度的升高，PP6A 的溶解度逐渐增大。

表 1 PP6A 在不同温度下的溶解度

Table 1 Solubility of PP6A at different temperatures

温度/°C	溶解度/(mg·mL ⁻¹)	温度/°C	溶解度/(mg·mL ⁻¹)
25	360	40	368
30	363	50	376

2.2 GK/PP6A 包合物的制备处方工艺筛选与优化

2.2.1 GK/PP6A 包合物的制备 以 PP6A 作为芫花素的药物载体即主体分子，芫花素为客体分子，采用饱和水溶液法制备 GK/PP6A 包合物。按照不同物质的量比(PP6A：芫花素)准确称取定量的 PP6A 与芫花素；用不同比例的无水甲醇与水作为溶剂，将芫花素溶解于甲醇中超声 30 min 使其充分溶解，同时将 PP6A 放入圆底烧瓶中加入适量的超纯水将其溶解，并于不同温度下搅拌使其充分溶解，然后将提前准备好的芫花素溶液缓慢加入搅拌一段时间，反应结束后，处理滤液得 GK/PP6A 包合物。

2.2.2 芫花素线性关系考察 使用 UV-2600i 型紫外

分光光度计进行紫外-可见光谱测试,研究芫花素的标准曲线时,采用 DMSO 与水的混合溶剂(1:1),并在最大吸收波长($\lambda=340\text{ nm}$)处测定紫外吸收光谱。配制质量浓度为 10 mmol/L 的芫花素溶液,然后依次取 2、4、6、8、10、12、14、16、18 μL 的芫花素溶液,分别稀释到 $3\,000\text{ }\mu\text{L}$ 的溶液(DMSO-水 1:1)中,并在最大吸收波长处($\lambda=340\text{ nm}$)测定紫外吸收光谱,以 A 值对质量浓度(C)作图,得线性回归方程为 $A=16.572\,62\,C-0.001\,35$, $r=0.999\,6$,结果表明芫花素在 $1.904\,5\sim 17.169\,3\text{ mg/L}$ 线性关系良好。

2.2.3 单因素实验考察 GK/PP6A 包合物的制备处方工艺

(1)PP6A 与芫花素物质的量比:固定包合温度为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,包合时间为 8 h ,甲醇与水的体积比为 1:8,分别在 PP6A 与芫花素的物质的量比为 1:1、1:2、1:3、1:4 的条件下制备包合物,通过包合率考察不同物质的量比对包合工艺的影响。结果包合率分别为 30.13%、46.37%、44.26%、37.62%,结果表明,当 PP6A 与芫花素的物质的量比为 1:2 时,包合率最大,故选择 PP6A 与芫花素物质的量比的研究范围为 1:1~1:3。

(2)包合温度:固定 PP6A 与芫花素的物质的量比为 1:2,包合时间为 8 h ,甲醇与水的体积比为 1:8,分别在包合温度为 20、30、40、 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下进行包合物的制备,通过包合率考察不同物质的量比对包合工艺的影响。结果包合率分别为 38.17%、45.63%、45.11%、41.98%,结果表明,当包合温度为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,包合率最大,故选择包合温度的研究范围为 $30\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

(3)包合时间:固定 PP6A 与芫花素的物质的量比为 1:2,包合温度为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,甲醇与水的体积比为 1:8,分别在包合时间为 6、8、10、 12 h 的条件下制备包合物,通过包合率考察不同物质的量比对包合工艺的影响。结果包合率分别为 32.07%、46.48%、45.01%、43.21%,结果表明,当包合时间为 8 h 时,包合率最大,故选择包合时间的研究范围为 $6\sim 10\text{ h}$ 。

(4)甲醇与水的体积比:固定 PP6A 与芫花素的物质的量为 1:2,包合温度为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,包合时间为 8 h ,分别在甲醇与水的体积比为 1:4、1:6、1:8、1:10 的条件下制备包合物,通过包合率考察不同物质的量比对包合工艺的影响。结果包封率

分别为 29.76%、37.35%、48.59%、43.78%,结果表明,当包合溶剂体积比为 1:8 时,包合率最大,故选择甲醇与水体积比的研究范围为 1:6~1:10。

2.2.4 正交试验优化 GK/PP6A 包合物的制备处方工艺 通过单因素试验得出的各试验因素水平,以包合率^[27]为评价指标设计正交试验,以 PP6A 与芫花素的物质的量比(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 $L_9(3^4)$ 设计正交试验,试验设计与结果见表 2。通过正交试验直观分析结果表明,4 种因素对包合率的影响顺序为 $D>A>C>B$,即甲醇与水的体积比>PP6A 与芫花素的物质的量比>包合时间>包合温度。由测试结果可知,最优制备工艺为 $A_1B_3C_2D_3$,当 PP6A 与芫花素的物质的量比为 1:1,包合温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$,包合时间 8 h ,甲醇与超纯水体积比为 1:8 时包合率最高,为 89.93%。

从表 3 可知,因素 A 和 D 在不同水平间存在差异($P<0.05$),为 GK/PP6A 包合物的制备工艺中较为重要的影响因素,B 和 C 因素在不同水平间不存

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Table 2 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

序号	A	B/ $^{\circ}\text{C}$	C/h	D	包合率/%
1	1:1(1)	30(1)	6(1)	1:4(1)	34.13
2	1:1(1)	40(2)	8(2)	1:6(2)	57.00
3	1:1(1)	50(3)	10(3)	1:8(3)	89.93
4	1:2(2)	30(1)	8(2)	1:8(3)	59.46
5	1:2(2)	40(2)	10(3)	1:4(1)	22.36
6	1:2(2)	50(3)	6(1)	1:6(2)	13.65
7	1:3(3)	30(1)	10(3)	1:6(2)	13.11
8	1:3(3)	40(2)	6(1)	1:8(3)	38.29
9	1:3(3)	50(3)	8(2)	1:4(1)	19.08
K_1	181.06	106.70	86.07	75.57	
K_2	95.47	117.65	135.54	83.76	
K_3	70.48	122.66	125.40	187.68	
R	110.58	15.96	49.47	112.11	

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	2 242.009 4	2	1 121.004 7	50.480 0	$P<0.05$
B	44.413 8	2	22.206 9	1.000 0	
C	455.216 6	2	227.608 3	10.249 4	
D	2 603.899 4	2	1 301.949 7	58.628 2	$P<0.05$

$F_{0.05}(2, 2)=19.00$ $F_{0.01}(2, 2)=99.00$

在显著性差异，为次要影响因素。

2.2.5 GK/PP6A 包合物的制备处方工艺确定 采用“2.2.3”项中的优化方法制备 GK/PP6A 包合物，准确称取 PP6A (14.2 mg, $M=2\,243.980\text{ g/mol}$, 6.30 μmol), 荜花素 (1.8 mg, $M=284.268\text{ g/mol}$, 6.30 μmol), 将荜花素溶解于 1.5 mL 的甲醇中超声 30 min 充分溶解, 同时将 PP6A 放入 25 mL 圆底烧瓶中, 加入 12 mL 的超纯水使其充分溶解, 然后将提前准备好的荜花素溶液缓慢加入烧瓶中, 50 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 8 h。反应结束后旋转蒸发除去溶剂, 并向圆底烧瓶中加入适量超纯水超声溶解, 用 0.45 μm 的醋酸纤维滤头滤除滤液中未进入柱芳烃空腔的, 沉淀于溶液中的荜花素, 再次旋转蒸发除去溶剂, 真空干燥, 得 GK/PP6A 包合物。

2.3 GK/PP6A 包合物的表征

2.3.1 FT-IR 分析 通过 Nicolet IS10 傅里叶变换红外光谱仪测试荜花素、PP6A 和 GK/PP6A 的红外光谱信息。采用压片法将样品与溴化钾 (样品-KBr 1:100) 研磨制成薄片测定红外吸收光谱。PP6A、荜花素和 GK/PP6A 包合物的 FT-IR 如图 2 所示, 从主体分子 PP6A 的红外吸收光谱图中可以看出 1 217、1 144 cm^{-1} 处为 PP6A 分子上 P=O 的伸缩振动吸收峰, 797、702、546 cm^{-1} 处为 PP6A 苯环上 C-H 的弯曲振动吸收峰。荜花素的红外吸收光谱显示了其在 3 269 cm^{-1} 处具有羟基-OH 的伸缩振动峰, 2 935 cm^{-1} 处为荜花素 21 号原子处的-CH₃的伸缩振动峰, 1 669 cm^{-1} 处为羰基的伸缩振动, 1 499 cm^{-1} 处为苯环上的 C=C 骨架伸缩振动, 1 119 cm^{-1} 处为 C-O-C 的弯曲振动。当荜花素与 PP6A 形成包合物后, 荜花素在 3 269 cm^{-1} 处的-OH 伸缩振动峰消失, 2 935、1 669、1 499、1 119 cm^{-1} 处的红外吸收特征

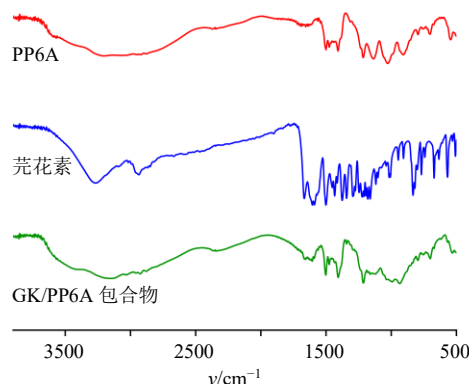


图 2 PP6A、荜花素、GK/PP6A 包合物的 FT-IR 吸收光谱图
Fig. 2 FT-IR absorption spectra of PP6A, genkwanin, and GK/PP6A inclusion complex

峰均明显减弱, 而 1 217、1 144、797 cm^{-1} 处的 PP6A 的特征峰的吸收强度基本不变, 据包合前后主客体特征峰波数与吸收强度的变化, 可推断出成功制备了 GK/PP6A 包合物。

2.3.2 XRD 分析 使用 X 粉末射线衍射仪对样品进行 XRD 测试, 测试条件为 Cu K α ($\lambda=0.154\,06\text{ nm}$), 2θ 扫描区间从 $10^{\circ}\sim 90^{\circ}$, 管电压 40 kV, 管电流 40 mA, 扫描速率 $10^{\circ}/\text{min}$ 。PP6A、荜花素和 GK/PP6A 包合物的 XRD 如图 3 所示, PP6A 在 2θ 值为 13.13° 和 15.16° 处有 2 个弱的衍射峰, 在 $19.24^{\circ}\sim 21.31^{\circ}$ 有 1 个弱的宽衍射峰, 呈现出明显的无定形结构。荜花素呈现出良好的晶型结构, 在 2θ 值为 10.79° 、 14.16° 和 18.66° 处有较强且尖锐的衍射峰, 且在 12.21° 、 16.25° 、 21.33° 、 24.55° 、 26.90° 、 28.75° 和 44.19° 处也均有明显尖锐的衍射峰, 当荜花素与 PP6A 形成包合物后, 显示出了不同于主体或客体的衍射模式, 包合后 PP6A 与荜花素的特征衍射峰基本消失, 此外, GK/PP6A 包合物在 21.95° 和 31.23° 处出现了较强且尖锐的衍射峰。实验结果表明, 主客体包合前后其晶型结构、衍射峰位置和强度均有变化, 说明包合物成功制备。

2.3.3 SEM 分析 采用 NOVA NANOSEM-450 型扫描电子显微镜对样品的表面形态进行扫描, 将样品均匀分散在金属样品台上, 并在真空中喷金处理。在 30 kV 的激发电压下拍摄得到 SEM 图像。SEM 是物质表面结构定性分析最常用的方法之一, PP6A、荜花素和 GK/PP6A 的 SEM 图如图 4 所示, 由 SEM 测试结果可知, PP6A 的表面形态平整光滑且均匀分布着细碎的小斑点, 形状为规则的片状; 荜花素的表面形态呈现为细长的针状, 形似一簇堆叠的松针; GK/PP6A 的表面形态呈现出表面略粗糙

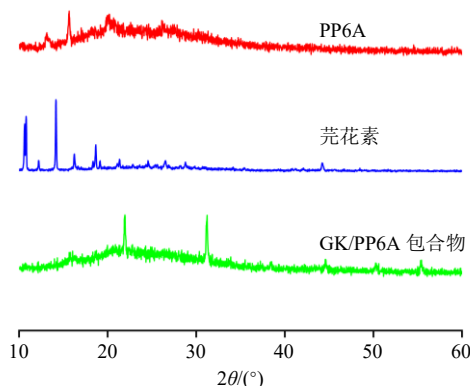


图 3 PP6A、荜花素、GK/PP6A 包合物的 XRD 图
Fig. 3 XRD patterns of absorption spectra of PP6A, genkwanin and GK/PP6A inclusion complex

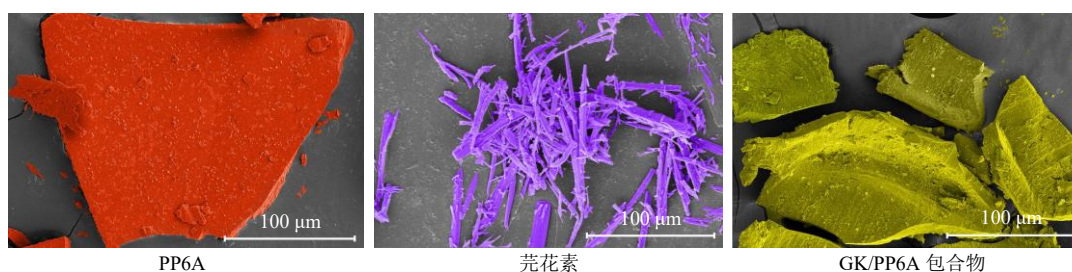


图 4 PP6A、芫花素、GK/PP6A 包合物的 SEM 图像 (SEM 图经 Photoshop 染色)

Fig. 4 SEM images of PP6A, genkwanin and GK/PP6A inclusion complex (SEM image stained by Photoshop)

且带有条状纹理的块状结构, 包含前表面细碎的小斑点基本消失, 呈现出与前两者不同的表面形态。包含前后表面形貌的变化, 初步揭示了 GK/PP6A 包合物的形成。

2.3.4 DSC 分析 采用 Netzsch STA 449F3 型差示扫描量热仪, 设置升温速率为 10 °C/min, 温度范围 35~150 °C, 氩气体积流量为 240 mL/min, 对 PP6A、芫花素和 GK/PP6A 包合物进行差示扫描量热测定, 得到 DSC 曲线。如图 5 所示, PP6A 在 76.76 °C 和 212.09 °C 分别有 1 个吸热峰, 在 560.89 °C 有 1 个放热峰。芫花素在 285.10 °C 和 408.29 °C 分别有 1 个吸热峰, 在 600.92 °C 有 1 个放热峰。当芫花素与 PP6A 形成包合物以后, 芫花素与 PP6A 的特征峰均有减弱或消失, 且在 464.27 °C 和 484.67 °C 出现了新的放热峰, 515.21 °C 出现了新的吸热峰。DSC 曲线分析结果表明, 芫花素与 PP6A 已形成包合物。

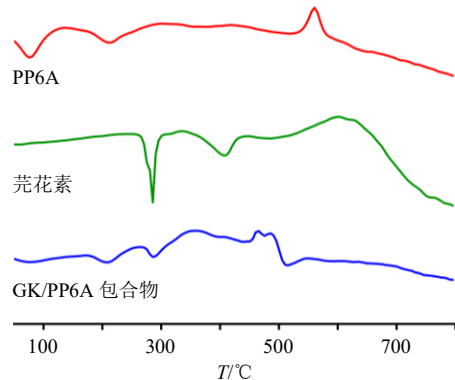


图 5 PP6A、芫花素、GK/PP6A 包合物的 DSC 图

Fig. 5 DSC curves of PP6A, genkwanin and GK/PP6A inclusion complex

2.4 NMR 分析

采用 BrukerAvance DRX 400 MHz 核磁共振波谱仪测试了芫花素、PP6A 和 GK/PP6A 的 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 和 2D NMR 谱图。其中, 芫花素采用 DMSO- d_6 作为溶剂, PP6A 和 GK/PP6A 均以 D_2O 作为溶剂, 氘代溶剂均以四甲基硅烷 (TMS) 作为

内标。

2.4.1 ^1H -NMR 分析 核磁共振波谱是研究主客包合物的有效方法^[28]。芫花素与 PP6A 进行主客体络合时, 化学位移会随着主客体的相互屏蔽作用发生变化, 因此可通过主体在包含前后质子的化学位移变化来推断客体分子是否顺利进入主体空腔中。PP6A 和 GK/PP6A 的 ^1H -NMR 如图 6 所示, GK/PP6A 包合物的 ^1H -NMR 同时包含了主客体分子的特征质子峰, 且包含前后 PP6A 的特征质子峰 H_1 、 H_2 、 H_3 、 H_4 的质子信号分别均向低场移动了 δ 0.05、0.05、0.04、0.11, 结果如表 4 所示, 核磁共振波谱测试结果表明成功制备了包合物。

2.4.2 2D-NMR 分析 主客体络合时空间邻近的 2 个质子产生的核奥弗豪泽效应 (nuclear Overhauser

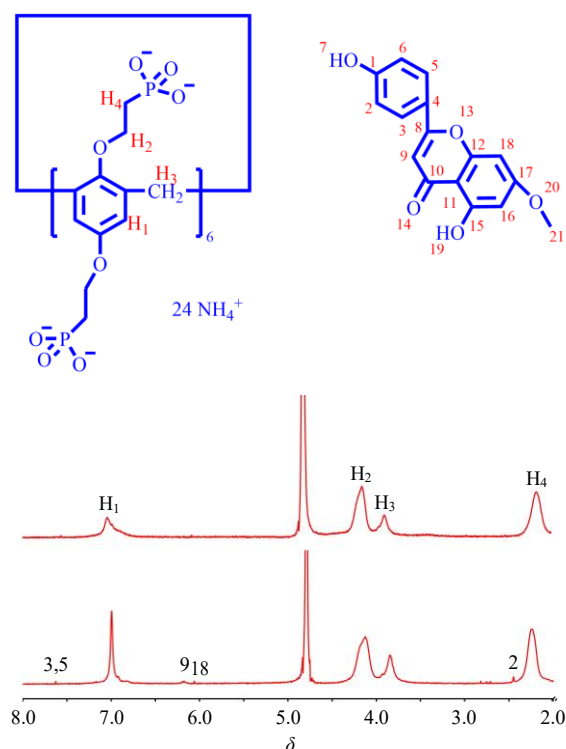


图 6 PP6A 与 GK/PP6A 的 ^1H -NMR 谱图

Fig. 6 ^1H -NMR spectra of PP6A and GK/PP6A

表 4 PP6A 包合前后的化学位移值 ($\Delta\delta_H$) 对照
Table 4 Comparison of chemical shift ($\Delta\delta_H$) values before and after PP6A inclusion

质子	PP6A	GK/PP6A	$\Delta\delta_H$
H-1	6.95 (12H, s)	7.00 (12H, s)	0.05
H-2	4.09 (24H, m)	4.14 (24H, m)	0.05
H-3	3.84 (12H, s)	3.88 (12H, s)	0.04
H-4	2.13 (24H, m)	2.24 (24H, m)	0.11

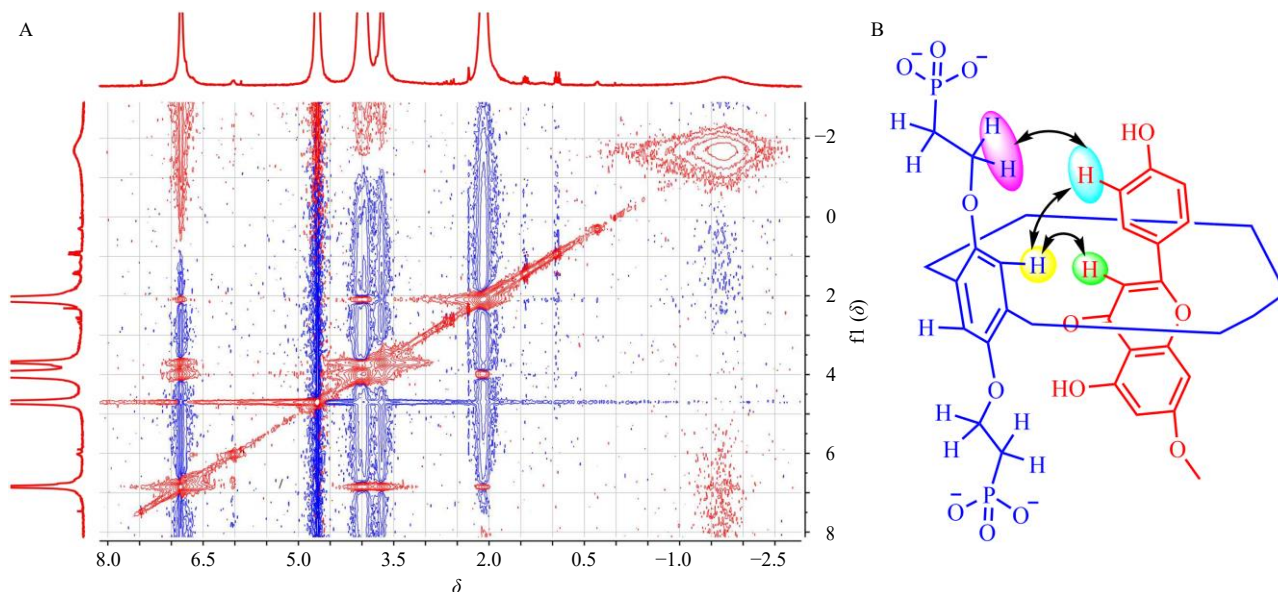


图 7 GK/PP6A 包合物的 2D NOESY 谱 (A) 及其可能的包合模式和关键的 NOE 相关 (B)

Fig. 7 Two-dimensional nuclear Overhauser effect spectroscopy (2D-NOESY) spectrum (A) and proposed inclusion modes associated with key nuclear Overhauser effects (NOEs) (B) of GK/PP6A inclusion complex

测定 GK/PP6A 的包合计量比^[29], 维持体系总浓度为 10.0 $\mu\text{mol/L}$, 保持荜花素与 PP6A 的物质的量比为 0:10、1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1、10:0, 并配制系列浓度梯度的混合溶液测定紫外吸收光谱, 以荜花素的摩尔分数为横坐标, A 值之差与荜花素的摩尔分数乘积为纵坐标, 绘制得 Job 曲线。如图 8-a 所示, 当荜花素的摩尔分数为 0.5 时, 溶液的 A 值之差与荜花素的摩尔分数乘积达到最大。由此可以得出 GK/PP6A 的包合物质的量比为 1:1。

2.5.2 紫外-可见光谱滴定实验分析 通过紫外-可见吸收光谱 (UV-Vis) 法探究了荜花素与 PP6A 间的主客体络合行为, 如图 8-b 所示, 保持荜花素的浓度为 10.0 $\mu\text{mol/L}$, 按照等浓度梯度依次加入 0~20.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 PP6A 溶液, 测定紫外吸收光谱。由测试结果可知, 随着 PP6A 溶液的加入混合溶液的 A 值逐渐增强, 说明荜花素与 PP6A 之间存在着较强的主客相互作用。根据滴定过程中 A 值的变化,

effect, NOE) 能有效证明主客体之间是否发生络合, 采用二维核磁共振波谱对样品进行分析, 结果如图 7 所示, 测试结果表明 PP6A 的 H-1 与荜花素的 H-2、H-9 存在 NOE 相关, PP6A 的 H-2 与荜花素的 H2 存在 NOE 相关, 说明荜花素成功进入 PP6A 的空腔内形成包合物。

2.5 光谱测定

2.5.1 Job 曲线测定 采用等物质的量连续变化法

采用 Benesi Hildebrand 曲线法^[30]求解得荜花素与 PP6A 的络合常数为 49 488 L/mol。

2.6 荜花素与 PP6A 的主客体包合模拟计算分析

采用 Gaussian 03 程序^[31]完成量化计算, PP6A 的初始结构由 Gaussian View 对全甲氧基柱[6]芳烃 (取自剑桥晶体数据库) 进一步修饰得到, 并用 PM6-D3H4 方法对 PP6A 的初始结构进行优化至结构达到几何平衡, 同时采用 Gaussian View 构建荜花素的初始结构至结构达到几何平衡。

采用 MOPAC2016 软件包进行半经验计算, 选用坐标放置法构建荜花素与 PP6A 的包合过程: 以荜花素分子上 13 号位置的氧原子作为定位点 m , 以 PP6A 上连接的亚甲基上的碳所构成圆的几何中心作为坐标原点 O , 并将 m 与 O 之间的距离定义为 D_{m-o} , 使荜花素分子从距离坐标原点的 10 nm 移动到 -10 nm, 每步移动 1 nm, 且均用 PM6-D3H4 方法对包合物结构进行全优化。

采用 AutoDock 4.2 程序^[32]对荜花素与 PP6A 的

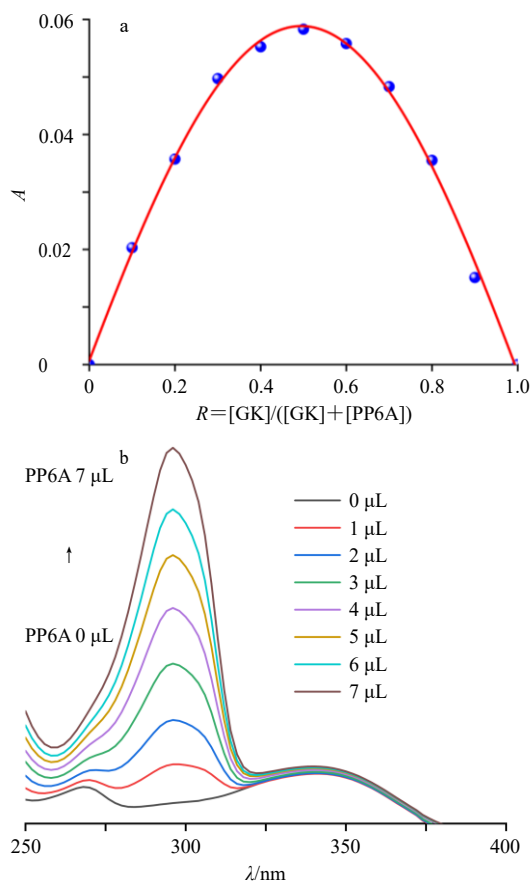


图 8 PP6A 与芫花素的 Job 曲线 (a) 和 PP6A 与芫花素的荧光滴定曲线 (b)

Fig. 8 Job curve between PP6A and genkwanin (a) and ultraviolet titration curves of PP6A and genkwanin (b)

包含模式进行深入探究并完成分子对接。将芫花素和 PP6A 分别作为配体分子和刚性受体分子进行分子对接模拟, 设置最大评估数为 2.5×10^6 , 执行 100 次构像搜索, 将芫花素对接到 PP6A 的空腔中, 并将构像搜索过程中均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD) 小于 0.2 nm 的构像归为一簇, 进行聚类分析。芫花素以每步 1 nm 的步长靠近并深入 PP6A 的空腔中, 整个过程的结合能变化曲线如图 9 所示, 由计算结果可知, 随着 D_{m-o} 减小, 当芫花素移动到 3 nm 时, 结合能为 -105.1844 kJ/mol , 此时结合能力达到最强, 此位置对应的 GK/PP6A 络合体系的结合模式如图 10-A 所示。

当芫花素移动到 3 nm 时, 客体芫花素置于 PP6A 的空腔中, 二者空间匹配度良好紧密结合, 与二维核磁共振氢谱推断的主客体可能的包含模式相互吻合。随着芫花素继续移动至 4~6 nm 间时, 由于 PP6A 支链和芫花素分子的扭转, 芫花素分子未能较好的置于 PP6A 的空腔中, 自 -7 nm 后, 随

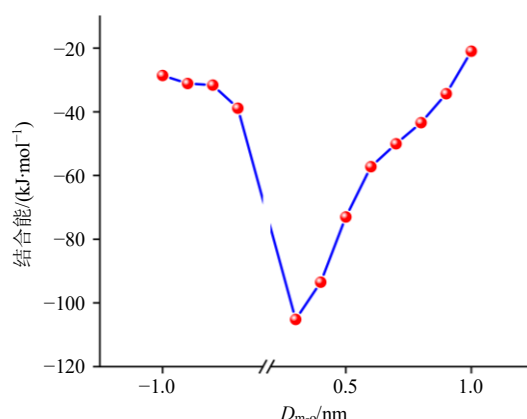


图 9 芫花素与 PP6A 的结合能变化曲线图

Fig. 9 Diagram of binding energy variation between genkwanin and PP6A

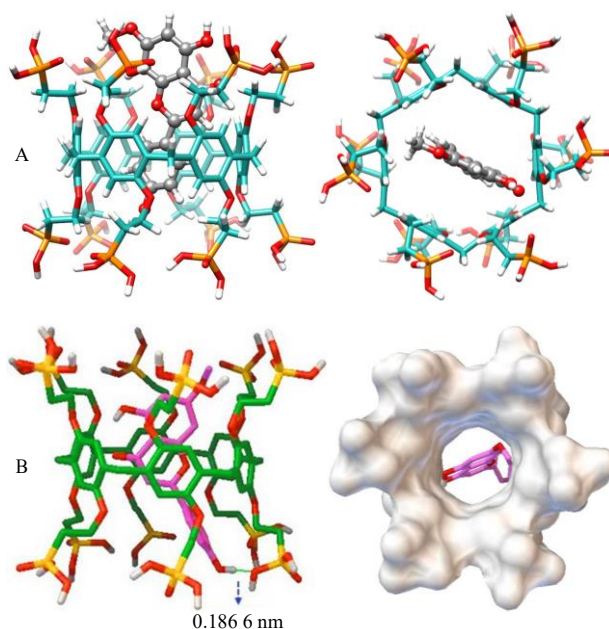


图 10 经 PM6-D3H4 优化后的最优 GK/PP6A 包含物模式 (A) 和 GK/PP6A 包含物分子对接最优构像 (B)

Fig. 10 Complexation patterns of optimal GK/PP6A inclusion complex after PM6-D3H4 optimization (A) and optimal molecular docking conformation of GK/PP6A inclusion complex (B)

着芫花素继续移动且即将脱离 PP6A 的空腔时, 因为空间斥力的减弱, 结合能力呈现出逐渐减弱的趋势。值得注意的是, 采用 AutoDock 4.2 程序对芫花素与 PP6A 的包含模式进行深入探究并完成分子对接后, 得到 GK/PP6A 包含物分子的对接最优构像如图 10-B 所示, 并发现芫花素分子 7 号位上的羟基暴露于 PP6A 的空腔外, 并与 PP6A 中苯环对位的醚氧原子形成了 1 条氢键, 长度为 0.1866 nm, 主客体间紧密结合并形成氢键, 进一步增强了主客

体间的结合能力。分子对接完成后，将 RMSD 小于 0.2 nm 的构像归为一簇，进行聚类分析，芫花素和 PP6A 的构像聚类分析如表 5 所示，分析结果表明对接结果收敛度较高，只有五簇形成。

表 5 芫花素与 PP6A 分子对接后的成簇分析
(RSD_{GK/PP6A} < 0.2 nm)

Table 5 Clustering analysis diagram of genkwanin and PP6A molecules after docking (RSD_{GK/PP6A} < 0.2 nm)

簇	结合能/(kJ·mol ⁻¹)	构像数	簇	结合能/(kJ·mol ⁻¹)	构像数
1	-7.85	50	4	-7.67	1
2	-7.77	20	5	-7.64	14
3	-7.74	15			

2.7 包合物的性能研究

2.7.1 包合物的溶解度测定实验 通过饱和溶液的方法测定芫花素和 GK/PP6A 包合物在水中的溶解度，分别制备芫花素和 GK/PP6A 包合物的饱和水溶液，并通过芫花素的紫外吸收标准曲线分别计算出芫花素包合前后的溶解度。实验结果表明，芫花素包合前的溶解度为 3.5 μg/mL，包合后的溶解度为 540.5 μg/mL，约提高了 155 倍，由此可知 PP6A 能有效的改善芫花素的溶解度。

2.7.2 包合物的稳定性实验 胃和肠道是人体吸收口服药物的主要场所，因此模拟生物体环境对芫花素和 GK/PP6A 的稳定性进行探究^[33]。设置 2 组实验，每组各取 2 个 25 mL 量瓶，分别向瓶中依次加入 0.01 mmol/L 的芫花素溶液和 4 mmol/L 的 PP6A 溶液，用 pH 1.5（模拟人体胃液）和 pH 7.6（模拟人体肠液）的缓冲溶液与甲醇的混合液（4：1）分别稀释至刻度，37 °C 恒温孵育 1 h，于最大吸收波长处测定其 A 值，然后避光保存，每隔 12 h 测定其 A 值，连续测定 72 h，每组实验平行测定 3 次。芫花素和 GK/PP6A 的稳定性如图 11 所示，在模拟人体的胃液环境中，芫花素在 0~36 h 的相对 A 值呈现出明显的下降趋势，至 36 h 下降了 85.45%，在模拟人体的肠液环境中，芫花素在 0~24 h 的相对吸光度（ A/A_0 ， A 为每 12 h 内所测吸光度， A_0 为初始吸光度）呈现出明显的下降趋势，至 24 h 下降了 96.51%，而 GK/PP6A 包合物的相对 A 值在模拟的胃液与肠液的环境中均表现为下降趋势平缓。实验结果表明芫花素在形成包合物后稳定性显著提高。

3 讨论

选取 PP6A 作为药物载体，芫花素为客体分子，

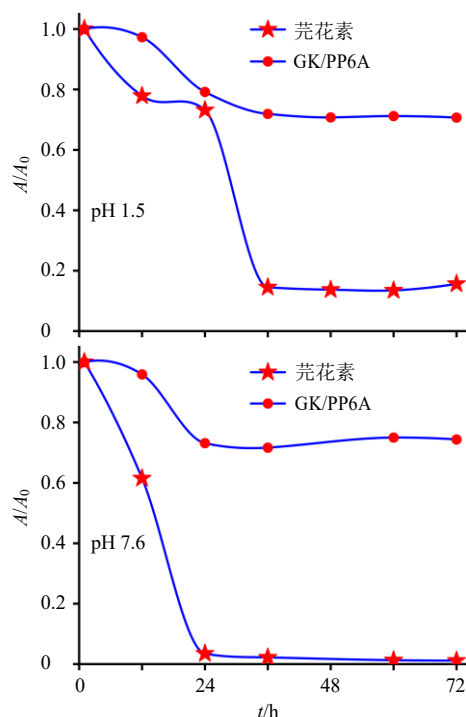


图 11 芫花素和 GK/PP6A 包合物在 pH 1.5 和 pH 7.6 的条件下的 A/A_0 随时间变化图

Fig. 11 Plot of relative absorbance A/A_0 of genkwanin and GK/PP6A inclusion complex with time at pH 1.5 and pH 7.6

构筑了一种新型的 GK/PP6A 超分子包合物。以包合物的包合率为指标设计正交试验，得 GK/PP6A 包合物的最优制备工艺为 PP6A 与芫花素的物质的量比为 1：1，包合温度为 50 °C，包合时间 8 h，甲醇与超纯水体积比为 1：8，包合率为 89.93%。并探究了 4 个因素在不同水平间的显著性差异，包合时间在不同水平间存在显著性差异，是包合物的制备工艺的重要影响因素。

采用核磁共振波谱、FT-IR、XRD、SEM 和 DSC 等分析测试方法对包合物进行了表征，主客体在包合前后其理化性质发生了明显变化。通过半经验分子轨道法和分子对接揭示了芫花素与 PP6A 最稳定的包合模式，疏水作用和氢键作用为包合物形成的主要驱动力。进一步通过紫外可见吸收光谱探究了芫花素和 PP6A 的物质的量比及络合常数，试验结果表明，芫花素和 PP6A 以物质的量比 1：1 形成超分子包合物，其络合常数为 49 488 L/mol，芫花素与 PP6A 之间存在着较强的主客相互作用。包合物的性能研究实验结果表明，芫花素与 PP6A 形成超分子包合物后，水溶解性和稳定性显著提高，其中水溶解性由 3.5 μg/mL 提升至 540.5 μg/mL，约提高了 155 倍，PP6A 是芫花素的优良药物载体。

综上所述, 该研究为天然药物分子芫花素在临床上药物制剂的研究和制备奠定了一定的基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Altinier G, Sosa S, Aquino R P, *et al.* Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(5): 1718-1723.
- [2] Sadhu S K, Okuyama E, Fujimoto H, *et al.* Prostaglandin inhibitory and antioxidant components of *Cistus laurifolius*, a Turkish medicinal plant [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 108(3): 371-378.
- [3] Sun Y W, Bao Y, Yu H, *et al.* Anti-rheumatoid arthritis effects of flavonoids from *Daphne genkwa* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 83: 106384.
- [4] Li Q, Zhang P L, Cai Y. Genkwanin suppresses MPP⁺-induced cytotoxicity by inhibiting TLR4/MyD88/NLRP3 inflammasome pathway in a cellular model of Parkinson's disease [J]. *NeuroToxicology*, 2021, 87: 62-69.
- [5] Martini N D, Katerere D R P, Eloff J N. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 93(2/3): 207-212.
- [6] Gao Y, Liu F, Fang L, *et al.* Genkwanin inhibits proinflammatory mediators mainly through the regulation of miR-101/MKP-1/MAPK pathway in LPS-activated macrophages [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96741.
- [7] Bao Y, Sun Y W, Ji J, *et al.* Genkwanin ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats through inhibiting JAK/STAT and NF- κ B signaling pathways [J]. *Phytomedicine*, 2019, 63: 153036.
- [8] Chen Z S, He Y H, Hu F, *et al.* Genkwanin alleviates mitochondrial dysfunction and oxidative stress in a murine model of experimental colitis: The participation of Sirt1 [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2022, 52(2): 301-313.
- [9] 张志强, 李石飞, 张立伟, 等. 黄芫花化学成分及其抗乙肝病毒作用 [J]. *中草药*, 2017, 48(7): 1292-1297.
- [10] Kraft C, Jenett-Siems K, Siems K, *et al.* *In vitro* antiplasmodial evaluation of medicinal plants from Zimbabwe [J]. *Phytother Res*, 2003, 17(2): 123-128.
- [11] Kim A R, Zou Y N, Park T H, *et al.* Active components from *Artemisia iwayomogi* displaying ONOO⁻ scavenging activity [J]. *Phytother Res*, 2004, 18(1): 1-7.
- [12] Ao H, Li Y J, Li H W, *et al.* Preparation of hydroxy genkwanin nanosuspensions and their enhanced antitumor efficacy against breast cancer [J]. *Drug Deliv*, 2020, 27(1): 816-824.
- [13] 冀春茹, 刘延泽, 冯卫生, 等. 芫花叶黄酮化化合物的研究: 芫根甙的结构 [J]. *中草药*, 1986, 17(11): 7-9.
- [14] Fielden S D P, Leigh D A, McTernan C T, *et al.* Spontaneous assembly of rotaxanes from a primary amine, crown ether and electrophile [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(19): 6049-6052.
- [15] Falaise C, Moussawi M A, Floquet S, *et al.* Probing dynamic library of metal-oxo building blocks with γ -cyclodextrin [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(36): 11198-11201.
- [16] Karpus A, Yesypenko O, Boiko V, *et al.* Synthesis of an enantiomerically pure inherently chiral calix[4]arene phosphonic acid and its evaluation as an organocatalyst [J]. *J Org Chem*, 2018, 83(3): 1146-1153.
- [17] Hirani Z, Taylor H F, Babcock E F, *et al.* Molecular recognition of methionine-terminated peptides by cucurbit[8]uril [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(38): 12263-12269.
- [18] Ogoshi T, Kanai S, Fujinami S, *et al.* Para-Bridged symmetrical pillar[5]arenes: Their Lewis acid catalyzed synthesis and host-guest property [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(15): 5022-5023.
- [19] Yang Y H, Tao X, Bao Q L, *et al.* A highly selective supramolecular fluorescent probe for detection of Au³⁺ based on supramolecular complex of pillar[5]arene with 3, 3'-dihydroxybenzidine [J]. *J Mol Liq*, 2023, 370: 121018.
- [20] Cao Y, Hu X Y, Li Y, *et al.* Multistimuli-responsive supramolecular vesicles based on water-soluble pillar[6]arene and SAINT complexation for controllable drug release [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(30): 10762-10769.
- [21] Ding Y, Wang C W, Ma Y X, *et al.* pH/ROS dual-responsive supramolecular polypeptide prodrug nanomedicine based on host-guest recognition for cancer therapy [J]. *Acta Biomater*, 2022, 143: 381-391.
- [22] Lan S, Ling L, Wang S Y, *et al.* Pillar[5]arene-integrated three-dimensional framework polymers for macrocycle-induced size-selective catalysis [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14(3): 4197-4203.
- [23] Wanderlind E H, Liz D G, Gerola A P, *et al.* Imidazole-functionalized pillar[5]arenes: Highly reactive and selective supramolecular artificial enzymes [J]. *ACS Catal*, 2018, 8(4): 3343-3347.
- [24] Zhang G, Lou X Y, Li M H, *et al.* A pillar[5]arene-based crosslinked polymer material for selective adsorption of organic dyes [J]. *Dyes Pigm*, 2022, 206: 110576.
- [25] Wheate N J, Dickson K A, Kim R R, *et al.* Host-guest complexes of carboxylated pillar[n]arenes with drugs [J].

- J Pharm Sci*, 2016, 105(12): 3615-3625.
- [26] Hu X Y, Liu X, Zhang W Y, *et al.* Controllable construction of biocompatible supramolecular micelles and vesicles by water-soluble phosphate pillar[5,6]arenes for selective anti-cancer drug delivery [J]. *Chem Mater*, 2016, 28(11): 3778-3788.
- [27] 刘雪城, 丁平刚, 金皓洁, 等. 反式西红花酸-环糊精包合物的制备、表征、安全性和抗肿瘤评价 [J]. *中草药*, 2022, 53(15): 4663-4672.
- [28] Roy N, Bomzan P, Nath Roy M. Probing host-guest inclusion complexes of ambroxol hydrochloride with α - & β -cyclodextrins by physicochemical contrivance subsequently optimized by molecular modeling simulations [J]. *Chem Phys Lett*, 2020, 748: 137372.
- [29] Du J J, Zhao L J, Yang S L, *et al.* Preparation, characterization, solubilization and antioxidant activity of polyamine modified β -cyclodextrins with baicalein inclusion complexes [J]. *J Inclusion Phenom Macrocycl Chem*, 2019, 93(3/4): 203-213.
- [30] Xiao X D, Shi L, Guo L H, *et al.* Determination of dopamine hydrochloride by host-guest interaction based on water-soluble pillar[5]arene [J]. *Spectrochim Acta A*, 2017, 173: 6-12.
- [31] Řezáč J, Hobza P. Advanced corrections of hydrogen bonding and dispersion for semiempirical quantum mechanical methods [J]. *J Chem Theory Comput*, 2012, 8(1): 141-151.
- [32] 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.
- [33] 古捷, 杨俊丽, 鲁佳佳, 等. 槐果碱与 β -环糊精及其衍生物的包合行为研究 [J]. *分析化学*, 2022, 50(5): 781-793.

[责任编辑 郑礼胜]