

• 研究论文 •

羟丙基- β -环糊精与丹参酮 IIA 包合作用的研究

闫金红 张翠萍 杨 频*

(山西大学分子科学研究所 化学生物学与分子工程教育部重点实验室 太原 030006)

摘要 采用相溶解度法研究了丹参酮 IIA 在不同 pH 和不同摩尔浓度的羟丙基- β -环糊精水溶液中的溶解度及二者的包合常数; 采用热力学方法研究了温度对包合反应的影响, 计算了包合过程的熵变、焓变及自由能变化; 用分子模拟方法进一步证实了该包合物的形成; 用红外光谱对固体包合物进行了表征。

关键词 羟丙基- β -环糊精; 丹参酮 IIA; 相溶解度法; 包合物; 热动力学; 分子模拟

A Study on Inclusion Complexes of Hydroxypropyl- β -cyclodextrin with Tanshinone IIA

YAN, Jin-Hong ZHANG, Cui-Ping YANG, Pin*

(Institute of Molecular Science, Key Laboratory of Chemical Biology of Molecular Engineering of Education Ministry, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract The inclusion complex formation of tanshinone IIA with hydroxypropyl- β -cyclodextrin was studied by using phase solubility method, and the formation constant for tanshinone IIA-hydroxypropyl- β -cyclodextrin was determined. The effect of temperature on the reaction was studied through thermodynamics, and the change of entropy, enthalpy and free energy of the reaction were calculated. The molecular modeling provided further evidence for the formation of the inclusion complexes. Stable inclusion complex in solid state was characterized by IR spectra.

Keywords hydroxypropyl- β -cyclodextrin; tanshinone IIA; phase solubility method; inclusion; thermodynamics; molecular modeling

中药丹参为唇形科鼠尾草属植物的根, 具有活血化瘀和抗菌消炎两大功效。基于这两大功效, 近年来丹参的各种制剂广泛应用于临床多种病症, 如心血管、肝炎、伤科、皮肤科及脱发等, 尤以冠心病疗效最为显著, 受到了医药界极大的重视和关注^[1,2]。丹参的脂溶性有效成分丹参酮 IIA (tanshinone IIA, Tan IIA) 属邻醌结构, 其化学结构如图 1^[3]。由于其难溶于水, 其药物的使用及药效的发挥受到了很大的限制。为了使它更好地得到应用, 就必须提高 Tan IIA 的溶解度和稳定性。通常采用有机溶剂、助溶剂、表面活性剂等途径来解决此问题,

但由于毒性、刺激性等原因, 限制了这些方法的运用。羟丙基- β -环糊精(hydroxypropyl- β -cyclodextrin, HPCD) 是 β -环糊精的一种亲水性衍生物, 对碱、热和光稳定, 作为药用辅料主要用作增溶剂、稳定剂和促渗剂等。由于 HPCD 低毒安全、有效, 被认为是极有潜力的注射用辅料^[4], 因此可采用 HPCD 对 Tan IIA 进行增溶, 从而得到较稳定的水溶液。有关这方面的研究国内未见报道。本实验采用相溶解度法(phase-solubility method)考察了 HPCD 对 Tan IIA 的增溶作用^[5,6], 使 Tan IIA 更好地得到利用。

* E-mail: yangpin@sxu.edu.cn; Tel./Fax: +86-351-7011022.

Received June 1, 2005; revised October 28, 2005; accepted December 15, 2005.

国家自然科学基金(No. 30470408)和山西省自然科学基金资助项目。

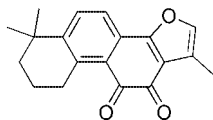


图 1 丹参酮 IIA 结构图

Figure 1 The structure of tanshinone IIA

1 仪器与试剂

HP-8453 型紫外分光光度计; Shimadzu 8300 FT-IR 光谱仪; HZS-H 水浴振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); KQ3200 超声波仪器(昆山市超声仪器有限公司); 丹参酮 IIA (Tan IIA)对照品(中国药品生物制品检定所); HPCD (Aldrich 产品); 其余试剂均为分析纯, 实验用水为三次蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 HPCD 对 Tan IIA 的增溶实验

2.1.1 紫外标准曲线的制备

精确称取 Tan IIA 对照品, 用少量甲醇溶解, 加入 pH 6.8 磷酸盐缓冲液, 使介质为 1:1 甲醇-磷酸缓冲体系, 配制成 1~10 mg/L 系列溶液, 以试剂空白为参比, 于波长 269 nm 处测定吸光度, 以吸光度(A)对浓度(c)进行线性回归, 回归方程为: $A = 0.1123c + 0.01642$, $r = 0.9996$ 。结果表明, Tan IIA 在 1~10 mg·L⁻¹ 范围内, 浓度和吸光度线性关系良好。HPCD 存在时, Tan IIA 吸收强度不受影响, 故标准曲线可以用于包合物存在下 Tan IIA 共存体系的测定^[6]。

2.1.2 平衡相溶解度曲线绘制

配制 pH 分别为 6, 6.8, 7.4, 8, 9 的磷酸盐缓冲液, 各 pH 溶液中再加入不同物质的量的 HPCD 制成 0, 6.65 × 10⁻³, 13.31 × 10⁻³, 33.27 × 10⁻³, 66.53 × 10⁻³, 133.07 × 10⁻³, 199.60 × 10⁻³, 266.12 × 10⁻³, 332.67 × 10⁻³ mol·L⁻¹ 的 HPCD 溶液。将过量的 Tan IIA 粉末加入上述溶液中, 超声 30 min, 置于 25 °C 水浴振荡器中振荡 48 h (100 t/min)。待溶液达到平衡, 取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 滤液稀释适当倍数, 在 269 nm 处测吸光度, 按外标一点法计算药物浓度。以 HPCD 摩尔浓度为横坐标, 药物浓度为纵坐标, 绘制平衡相溶解度图。结果见图 2。

2.1.3 讨论

由图 2 可见, 在各 pH 下, Tan IIA 的溶解度随着 HPCD 浓度的增大而显著提高, 表明 HPCD 对 Tan IIA 有较好的增溶效果。根据 Higuchi 等^[7]的分类, 该体系相溶解度图属于 A_L 型, 表明体系中形成 1:1 包合物。包合作用的强弱可以用形成常数 K_f 来表示。以 Tan IIA 溶

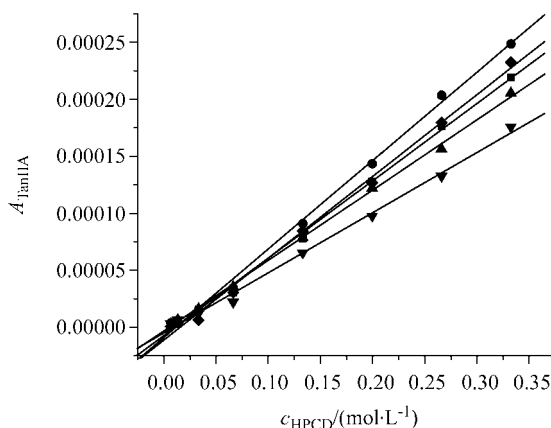


图 2 Tan IIA 在不同摩尔浓度 HPCD 溶液中的平衡相溶解度图

Figure 2 Phase solubility curves of tanshinone IIA in HPCD

▼—pH 6; ▲—pH 6.8; ■—pH 7.4; ◆—pH 8; ●—pH 9

解度(mol·L⁻¹)对 HPCD 浓度(mol·L⁻¹)进行线性回归, 得回归方程。根据回归方程, 计算形成常数 K_f ^[8], 计算公式为: $K_f = \text{斜率}/S_0(1 - \text{斜率})$, 其中斜率为回归方程的斜率, S_0 为 Tan IIA 在该 pH 下的溶解度。结果见表 1。

表 1 不同 pH 下 Tan IIA 的表观稳定常数 K_c Table 1 The stability constants K_c of tanshinone IIA at different pH

pH	线性方程	r	K_f
6.0	$Y = 5.07433 \times 10^{-4}c - 5.00869 \times 10^{-6}$	0.99753	9524
6.8	$Y = 6.17127 \times 10^{-4}c - 3.15836 \times 10^{-6}$	0.99937	6179
7.4	$Y = 6.78601 \times 10^{-4}c - 7.28468 \times 10^{-6}$	0.99866	5699
8.0	$Y = 7.17752 \times 10^{-4}c - 1.12359 \times 10^{-6}$	0.99801	3712
9.0	$Y = 7.75837 \times 10^{-4}c - 8.94324 \times 10^{-6}$	0.99852	1573

由表 1 可见, Tan IIA 与 HPCD 在 pH 为 6, 6.8 时形成常数较大, 表明两者在偏酸性溶液中包合作用较强。但由图 2 可知, 随 pH 的增大, 在碱性溶液中 Tan IIA 的溶解度明显提高, HPCD 的增溶效果也更加显著, 但由于 [OH⁻] 浓度增大, 而导致 Tan IIA 水解速度也明显加快。根据化学反应平衡原理可知, 由于 Tan IIA 的水解, 使得 Tan IIA 浓度减小, 生成的包合物将分解, 反应将向着包合反应的逆方向进行, 因此包合物稳定性降低, 表现在 K_c 值随 pH 的升高而减小。

2.2 热力学法研究包合作用

环糊精主、客体分子间包合作用力的主要来源是分子间存在的范德华力、疏水作用力、氢键作用力等, 故可以采用热力学的方法来分析包合过程, 以便使我们的理解更加深刻。包合反应的形成常数随温度的变化而变化, 它是重要的热力学参数之一, 进行热力学研究的方法主要有热滴定法、光谱法、电位法和色谱法

等^[9,10], 本文采用光谱法进行研究.

2.2.1 温度对包合反应的影响

在环糊精与客体分子形成包合物的过程中, 温度是影响包合作用的一个重要因素. 故通过一系列实验研究了不同温度下 Tan II A-HPCD 的包合过程, 得到了不同温度下该包合物的形成常数 K_f , 如图 3 所示. 由图 3 可以看出: 随着温度的升高, 包合体系的形成常数逐渐减小, 说明包合物可能趋于离解, 客体分子又从环糊精腔内重新进入水相, 包合物的稳定性降低. 从作用机理上分析, 可能是由于温度升高引起分子运动加剧而导致这种现象. 由此实验现象可以得出如下结论: 升高温度不利于包合反应的进行.

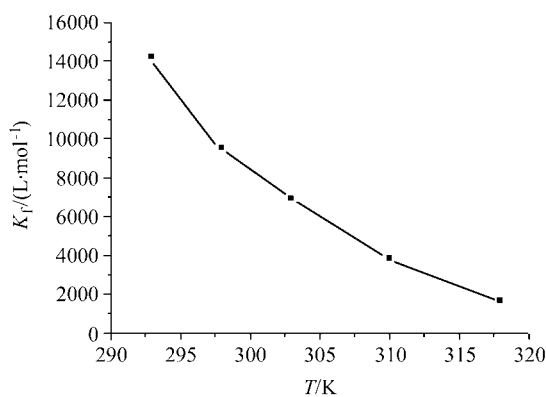


图 3 Tan II A-HPCD 包合物的形成常数 K_f 随温度的变化
Figure 3 Effect of temperature on the equalization constants K_f of complexes of Tan IIA-HPCD

2.2.2 热力学方法计算包合反应的熵变、焓变及自由能变化

由图 3 的数据, 根据范霍夫方程 $\ln K_f = \Delta_r H_m^\ominus / (RT) + \Delta_r S_m^\ominus / R$, 将 $\ln K_f$ 对 $1/T$ 作图, 如图 4 所示.

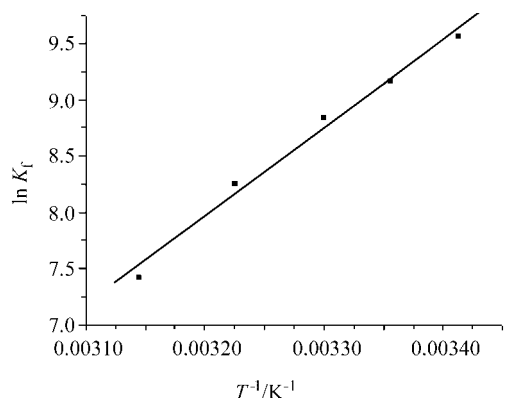


图 4 Tan II A-HPCD 包合物的 $\ln K_f$ 对 $1/T$ 作图
Figure 4 The curves of $\ln K_f$ vs. $1/T$ of complexes of Tan IIA-HPCD

由直线的截距可计算反应的熵变, Tan II A-HPCD 的线性回归方程为 $\ln K_f = 7889.0284T^{-1} - 17.29433$ ($r = 0.994$), 经计算得: $\Delta_r S_m^\ominus = -143.78 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$; 根据方程: $\Delta_r G_m^\ominus = -RT \ln K_f$ 可求得不同温度下的自由能变化, 再将 $\Delta_r S_m^\ominus$ 和 $\Delta_r G_m^\ominus$ 代入方程 $\Delta_r H_m^\ominus = \Delta_r G_m^\ominus + T\Delta_r S_m^\ominus$, 可以计算出不同温度下包合反应的焓变, 计算结果如表 2.

表 2 不同温度下 Tan II A-HPCD 包合物的形成常数 K_f , $\Delta_r S_m^\ominus$, $\Delta_r G_m^\ominus$ 及 $\Delta_r H_m^\ominus$

Table 2 Effect of temperature on K_f , $\Delta_r S_m^\ominus$, $\Delta_r G_m^\ominus$ and $\Delta_r H_m^\ominus$ of the inclusion complex of Tan II A-HPCD

T/K	$K_f / (\text{L}^2 \cdot \text{mol}^{-2})$	$\Delta_r S_m^\ominus / (\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta_r G_m^\ominus / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta_r H_m^\ominus / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
293	14192.9	-143.78	-23.289	-65.417
298	9524.28	-143.78	-22.698	-65.544
303	6913.30	-143.78	-22.272	-65.837
310	3808.92	-143.78	-21.250	-65.822
318	1661.71	-143.78	-18.386	-64.108

由表 2 可以看出, 包合反应的 $\Delta_r H_m^\ominus$ 均为负值, 说明包合过程是一个放热过程; $\Delta_r S_m^\ominus$ 为负值, 说明包合反应的主要驱动力是焓、范德华力、疏水作用力以及氢键作用力等, 分子内识别是包合过程中有利焓变的主要来源; 计算所得 $\Delta_r G_m^\ominus$ 也为负值, 表明包合反应过程是一个自发过程.

2.3 分子模拟实验^[11]

2.3.1 计算方法

分子模拟工作使用 Insight II 软件, 在 SGI 工作站上完成.

2.3.2 计算结果

我们研究了 HPCD 与 Tan II A 的两种包合模式: 模式 1 为 Tan II A 从 HPCD 的小口端插入; 模式 2 为 Tan II A 从 HPCD 的大口端插入. 两种模式的最优化构型如图 5 所示.

相应的能量结果见表 3.

表 3 中的数值单位均为 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 从图 5 和表 3 我们可以看出: Tan II A 从 HPCD 的小口和大口端插入后体系的总能量分别为 $781.744 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $728.39 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 表明 Tan II A 优先选择了大口端进入 HPCD, 这样形成的包合物能量最低, 结构最稳定. 详细的能量分析发现, Internal 是与键相关的能量, 它主要表现为氢键作用, 决定了体系的总能量. 另外, 非键作用力 Nonbond (范德华力 VDW 和静电力 Electrostatic 的) 也起了一定的作用. 这与前面的热力学分析相一致.

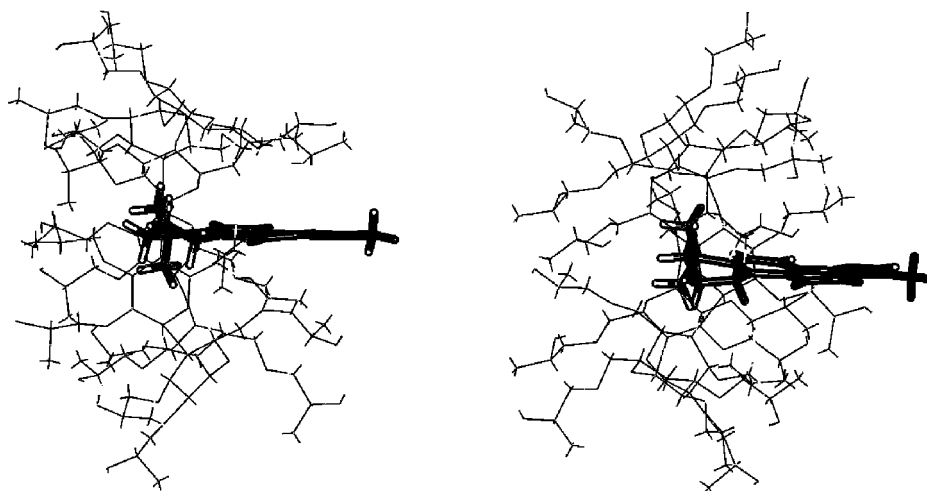


图5 HPCD 与 Tan II A 的两种包含模式最优化构型(左: 小口端; 右: 大口端)

Figure 5 The two most optimal inclusion modes of Tan II A-HPCD (left: minor port; right: major port)

表3 HPCD 与 Tan II A 的两种包含模式最优化构型的能量

Table 3 Energy of the most optimal inclusion modes of Tan II A-HPCD

	Total	Internal	Bond	Angle	Torsion	Out of plane	Nonbond	VDW	Electrostatic
Mode 1	781.74	701.11	72.17	352.71	275.64	0.59	80.63	77.19	3.43
Mode 2	728.39	665.63	67.45	331.33	266.44	0.42	62.76	72.59	-9.83

2.4 红外光谱研究^[12]

比较 HPCD, Tan II A, HPCD 和 Tan II A 混合物及 Tan II A-HPCD 包合物的红外光谱(如图 6), 发现 Tan II A 上的羰基的振动吸收峰在 1670 cm^{-1} , HPCD 和 Tan II

A 混合物中羰基的振动吸收峰没有移动, 而在 Tan II A-HPCD 包合物中羰基的振动吸收峰向短波方向移动到 1645 cm^{-1} , 这是由于在 Tan II A-HPCD 包合物中形成了氢键的作用. 此结果和分子模拟的结论是相符的.

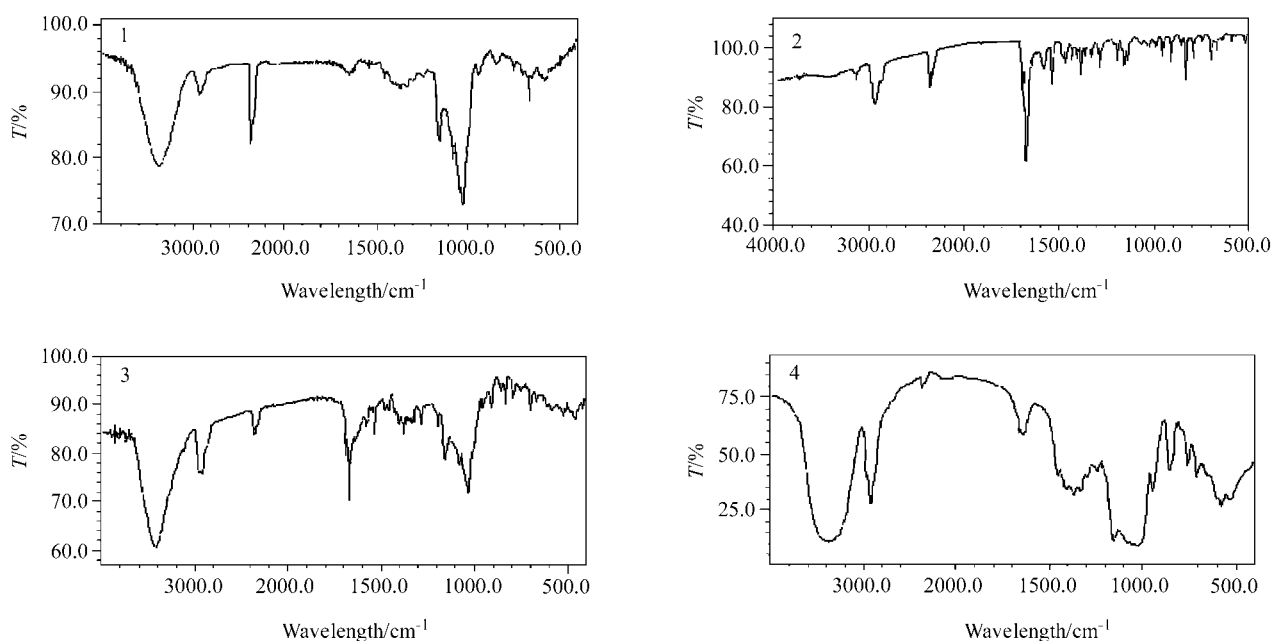


图6 HPCD (1), Tan IIA (2)及其混合物(3), 包合物(4)的红外光谱图

Figure 6 IR spectra of (1) HPCD alone, (2) Tan IIA alone, (3) mixture of HPCD and Tan IIA, and (4) inclusion complex

3 结论

本文采用相溶解度法证明了 Tan II A-HPCD 包合物的形成, 得知二者形成 1:1 的包合物, 通过改变溶液的酸碱度, 可知包合常数随 pH 的增大而减小, 这是由于 OH⁻ 浓度增大导致 Tan IIA 水解速度加快, 包合物稳定性降低. 另外, 本实验用热力学方法研究了温度变化对包合反应的影响, 探讨了包合过程可能的包合机制, 从热力学角度揭示了包合反应的驱动力, 根据范霍夫方程及相应的能量公式求出了 $\Delta_r S_m^\ominus$, $\Delta_r G_m^\ominus$ 及 $\Delta_r H_m^\ominus$ 等热力学参数, 从而得出升高温度不利于包合反应的进行, 包合过程是一个放热的自发过程, 包合反应的驱动力是焓, 有利于焓变的主要来源是分子内识别, 即范德华力和疏水作用力的结论. 这一结果在接下来的分子模拟试验中得到了验证. 最后, 通过红外光谱对固体包合物进行表征, 充分证实了 Tan II A-HPCD 包合物的形成.

References

- Liang, Y.; Yang, M.; Yuan, S.-L. *Chin. Tradit. Herbal Drugs* **2000**, *31*, 304 (in Chinese).
(梁勇, 羊明, 袁淑兰, 中草药, **2000**, *31*, 304.)
- Pei, Z.-H.; Zhou, G.-Z. *Chin. Pharmacol. Bull.* **1994**, *10*, 210 (in Chinese).
(裴振环, 周桂芝, 中国药理学通报, **1994**, *10*, 210.)
- Li, J. F.; Wei, Y. X.; Xu, Z. C.; Dong, C.; Shuang, S. M. *Spectrochim. Acta* **2004**, *60A*, 751.
- He, Z.-G.; Tang, X.; Chen, X.-F.; Zhang, R.-H.; Zhang, T.-H.; Song, Z.-J. *J. Shenyang Pharm. Univ.* **1998**, *15*, 235 (in Chinese).
(何仲贵, 唐星, 陈宜富, 张汝华, 张天虹, 宋志军, 沈阳药科大学学报, **1998**, *15*, 235.)
- Shi, J.-M.; He, Z.-G.; Xing, N.; Geng, G.-X.; Sun, Y.-H.; Li, H.-B. *Chin. Pharm. J.* **2004**, *39*, 353 (in Chinese).
(施洁明, 何仲贵, 邢楠, 耿革霞, 孙英华, 李鸿滨, 中国药理学杂志, **2004**, *39*, 353.)
- Shuang, S.-M.; Guo, J.-Y.; Pan, J.-H.; Li, L.; Cai, M.-Y. *Chin. J. Anal. Chem.* **1998**, *26*, 564 (in Chinese).
(双少敏, 郭祀远, 潘景浩, 李琳, 蔡妙颜, 分析化学, **1998**, *26*, 564.)
- Higuchi, T.; Connors, K. A. *Adv. Anal. Chem. Instrum.* **1965**, *4*, 117.
- Brewster, M. E.; Simphins, J. M.; Hora, M. S. *J. Parent. Sci. Technol.* **1989**, *43*, 231.
- Botsi, A.; Yannakopoulou, K.; Hadjoudis, E.; Waite, J. *Carbohydr. Res.* **1996**, 283.
- Suzuk, M.; Sasaki, Y.; Szejtli, J.; Fetuyvesi, E. J. *Inclusion Phenom.* **1987**, *5*, 459.
- Yang, P.; Fan, X.-Y.; Chen, S.-R.; Han, G.-Y. *Acta Chim. Sinica* **2001**, *59*, 1550 (in Chinese).
(杨频, 范晓毅, 陈世荣, 韩高义, 化学学报, **2001**, *59*, 1550.)
- Sun, D.-M.; Wu, X.-F.; Zhang, S.-L. *J. Anhui Agric. Sci.* **2005**, *33*, 596 (in Chinese).
(孙德梅, 武雪芬, 张淑玲, 安徽农业科学, **2005**, *33*, 596.)

(A0506012 LU, Y. J.; FAN, Y. Y.)