

LNG-HP-β-CD 包合物制备、表征及其紫外稳定性研究

王大伟^{1,2}, 刘琪^{3,4}, 刘明², 刘晓辉^{1*}

1. 中国农业科学院植物保护研究所, 杂草鼠害生物学与治理院重点开放实验室, 北京 100193
2. 中国科学院动物研究所农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101
3. 中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081
4. 农业部旱作节水农业重点开放实验室, 北京 100081

摘要 左炔诺孕酮(LNG)不溶于水和紫外光照易分解的特点,限制了其在鼠类不育剂中的应用。该研究采用溶液法,制备出LNG的羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD)包合物,建立了准确简便的紫外光谱定量检测方法;通过相溶解度法确定了HP-β-CD与LNG的包合摩尔比为1:1,25℃时LNG-HP-β-CD包合物的稳定常数为187.3 L·mol⁻¹;通过紫外光谱、傅里叶变换红外光谱表征,验证了包合物的形成;对包合物的抗紫外光降解性能进行了测试,表明在50 h内包合物的降解率小于5%,远低于药物单体。结果表明,HP-β-CD对LNG具有良好的包合作用,可显著提高该药物的水溶性和紫外稳定性。

关键词 羟丙基-β-环糊精;左炔诺孕酮;包合物;紫外吸收光谱;紫外光降解

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)03-0808-04

引言

左炔诺孕酮(Levonorgestrel, LNG, 图1)是不孕药物的主要成分,也广泛用于鼠类不育剂的研发和应用,可对多种野生害鼠的繁殖产生抑制^[1,2]。但是,由于LNG不溶于水,在研究中往往只能配制成悬浊液使用,给定量研究工作造成了很大困难^[3,4]。通常可采用有机溶剂、助溶剂、表面活性剂等方法来解决此类难溶药物的问题,但由于毒性、刺激性等原因,这些方法在动物实验中的应用受到限制。此外,由于鼠类不育剂的应用环境多为野外,而LNG在紫外光下易

降解,影响到实际应用中的药效持效期。因此,为了对LNG进行更深入的研究,非常有必要探究提高其水溶性和紫外光稳定性的方法。

β-环糊精(β-cyclodextrin, β-CD)是7个葡萄糖残基由α-1,4-糖苷键连接形成的环状结构,具有外亲水内疏水的特点,作为一种药用辅料已经被广泛的用作增溶剂、稳定剂和促渗剂等^[5,6]。目前,国内外对β-CD及其亲水性衍生物用于药物载体的研究日益重视^[7,8]。羟丙基-β-环糊精(Hydroxypropyl-β-cyclodextrin, HP-β-CD)是β-CD的衍生物之一,通常由β-CD与环氧丙烷在碱性水溶液中制得,具有比β-CD更好的水溶性及增溶效果,并可提高药物的稳定性,无毒副作用,在药物制剂中具广泛的应用^[9-13]。

目前,国内未见用HP-β-CD对LNG进行增加其水溶性研究的相关工作报道。本文研究了HP-β-CD对LNG的包合作用,利用溶液法制备了包合物,采用光谱手段对其进行表征,并评价包合物抗紫外光降解能力,以期对LNG的环糊精包合物新制剂的制备,以及拓展其在鼠类不育剂中的应用空间提供实验基础。

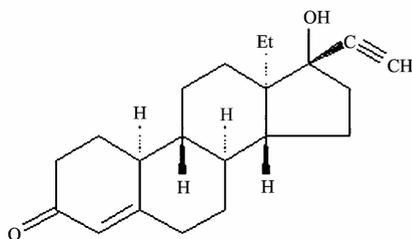


Fig. 1 Chemical structure of LNG

收稿日期: 2010-05-06, 修订日期: 2010-08-08

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2007CB109104)和农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室开放研究基金项目(ChineseIPM0804)资助

作者简介: 王大伟, 1981年生, 中国农业科学院植物保护研究所助理研究员 e-mail: dwwang@ippcaas.cn

* 通讯联系人 e-mail: lxiaohui2000@163.com

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LNG 购于北京紫竹药业公司, HP- β -CD 购于日本 Wako 公司(纯度 99%), 无水乙醇购于国药集团化学试剂公司, 所有试剂都为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津), Nexus670 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 Nicolet 公司), THZ-D 台式恒温震荡器(太仓市试验设备厂), KQ-50B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 检测方法的确定

1.2.1 检测波长的确定

配制浓度为 $120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LNG 无水乙醇溶液作为母液, 用无水乙醇稀释至 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 配制 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HP- β -CD 水溶液。对两溶液进行紫外光谱扫描, 结果表明, LNG 在 240 nm 处有明显的吸收峰, 而 HP- β -CD 除有末端吸收外无明显的吸收峰, 故选择 240 nm 作为 LNG 的测定波长。

1.2.2 标准曲线的测定

分别取 0.25, 1, 1.25, 2, 3, 4 和 6 mL 母液于 25 mL 容量瓶, 以无水乙醇定容, 充分摇匀, 在 240 nm 处测定吸光度。

1.3 相溶解度测定

配制浓度为 0.02, 0.05, 0.1 和 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 HP- β -CD 溶液(pH 7.0 的磷酸盐缓冲液), 量取适量溶液置于具塞试管中, 加入过量的 LNG, 超声分散 10 min。将具塞试管置于恒温震荡器上, 在 25 °C 避光的条件下震荡 48 h, 反应达到平衡。取上清液用孔径为 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤, 滤液稀释适当倍数后在 240 nm 处测定吸光度。

1.4 包合物制备

LNG 的包合物的制备方法采用溶液法。称取 1 g HP- β -CD 溶解于 10 mL 水中, 水浴控制温度在 50 °C, 缓慢滴加 LNG 的乙醇饱和溶液, 使得 HP- β -CD 与 LNG 摩尔比为 1:1, 至产生明显的白色晶体。溶液在通入氮气、避光条件下, 在磁力搅拌器上继续恒温搅拌 15 h 后, 用微孔滤膜过滤; 滤液在冰浴中静置 12 h 结晶, 过滤; 晶体用水和丙酮分别洗涤 2 次, 除去未反应的 HP- β -CD 和 LNG。样品真空干燥至恒重, 得到白色晶体粉末。

1.5 包合物表征

1.5.1 紫外可见光谱特征

LNG 用乙醇溶解, 配制浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LNG 的储备液; HP- β -CD 用水溶解, 配制浓度为 $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。准确移取五份 LNG 的储备液 1 mL 于 20 mL 比色管中, 加入 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液, 再依次分别加入 0, 1, 2, 3, 4 和 5 mL HP- β -CD 的溶液, 蒸馏水定容, 振摇均匀, 对该组溶液进行紫外光谱扫描。

1.5.2 红外光谱特征

分别将 LNG, HP- β -CD, HP- β -CD 与 LNG 的物理混合

物、HP- β -CD/LNG 包合物用 KBr 压片, 分别在 $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ 处检测其红外吸收光谱。

1.6 包合物的紫外稳定性研究

自然紫外线主要分为长波 UVA(315~400 nm)、中波 UVB(280~315 nm)和短波 UVC(200~280 nm)三种。其中以 UVA 的穿透力最强, 占到自然紫外线的 97% 左右^[14,15], 因此本实验采用主波长为 365 nm 的紫外光作为照射光源。

配制初始浓度相近的 LNG 溶液及其 HP- β -CD 包合物水溶液。将两种溶液放置在磁力搅拌器上低速搅拌, 并在主波长为 365 nm 的紫外灯下照射, 在 $t=0, 2, 5, 13, 26$ 和 50 h 时取样, 在 240 nm 测定吸光度。

2 结果与讨论

2.1 检测方法

结果表明, LNG 在浓度为 $2.39 \sim 28.68 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 吸光度(y)对浓度(x)有良好的线性关系, 线性回归方程为: $y=0.0567x+0.0288$, $R^2=0.9995$ 。

2.2 相溶解度研究

以 LNG 溶解度($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)对 HP- β -CD 浓度($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)进行线性回归, 得到相溶解度方程, 见表 1。LNG 随着 HP- β -CD 溶液浓度的增大而线性增加, 这说明 HP- β -CD 对其具有很好的增溶作用。根据 Higuchi 等的理论^[16], 该体系相溶解度曲线方程为典型的 A_L 型, 这说明体系中形成 1:1 的包合物。根据回归方程, 计算形成常数 K_f 可以由式(1)计算^[17]

$$K_f = \frac{k}{S_0(1-k)} \quad (1)$$

其中 k 为回归方程的斜率, S_0 为截距。

Table 1 Stability constants K_f and $T=25 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 7.0

相溶解度曲线方程	R^2	$K_f/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$
$A=0.0697c+0.0004$	0.9986	187.3

2.3 包合物表征结果

2.3.1 紫外可见光谱特征

由图 2 可知, 在 pH 7.0 条件下, 随着溶液中 HP- β -CD 浓度的逐渐增大, LNG 的最大吸收波长减小($\Delta\lambda \approx 2 \text{ nm}$), 并且最大吸光度值也逐渐增大。这说明 LNG 的共轭体系与 HP- β -CD 之间发生了包合作用, 可以认为是环糊精空腔内高电子密度诱导 LNG 分子发生移动, 使 LNG 的紫外可见光谱出现了轻微的蓝移。虽然 LNG 包合物的最大吸收波长蓝移了约 2 nm, 但这种变化很小, 环糊精的存在基本不影响其光吸收强度, 因此, 校正曲线可用于包合物存在下 LNG 的测定^[18]。

2.3.2 红外光谱特征

LNG, HP- β -CD, HP- β -CD 与 LNG 的物理混合物、HP- β -CD/LNG 包合物的红外光谱如图 3 所示。

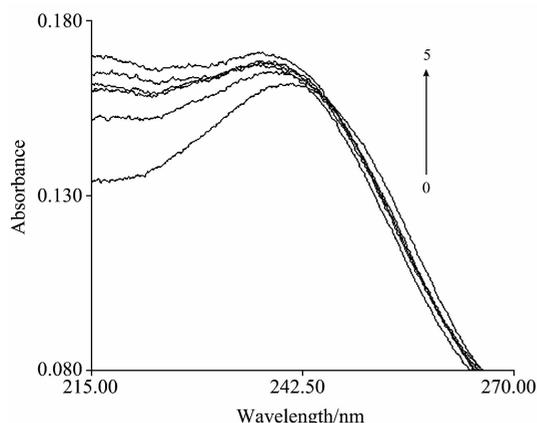


Fig. 2 UV spectra of LNG containing various concentration of HP- β -CD

HP- β -CD: 1: 0; 2: 8×10^{-5} ; 3: 1.6×10^{-4} ; 4: 2.4×10^{-4} ; 5: 3.2×10^{-4} ; 6: 4.0×10^{-4} mol \cdot L $^{-1}$, LNG: 5.0×10^{-6} mol \cdot L $^{-1}$, pH 7.0

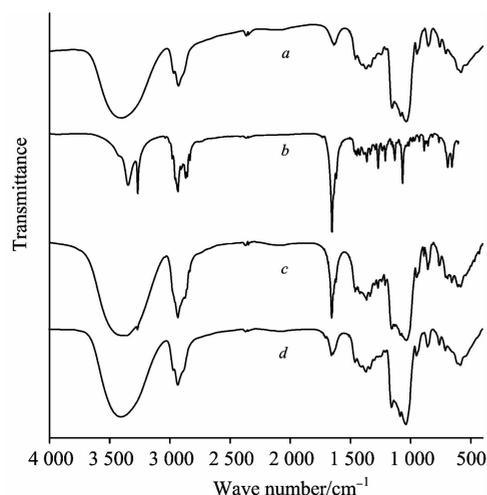


Fig. 3 IR spectra of HP- β -CD (a), LNG (b), HP- β -CD/LNG physical mixture (c) and HP- β -CD/LNG complex (d)

图 3a: HP- β -CD 的红外光谱图。3 401 cm^{-1} 处为 O—H 伸缩振动吸收峰, 2 930 和 1 459 cm^{-1} 处为 CH_3 和 CH_2 伸缩振动吸收峰, 1 370 和 1 036 cm^{-1} 处为 CH_3 面内对称弯曲振动和 C—O 伸缩振动吸收峰。

图 3b: LNG 的红外光谱图。3 342 cm^{-1} 是 O—H 伸缩振动吸收峰, 3 268 cm^{-1} 是 $\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ 炔基氢的伸缩振动吸收峰, 2 935 和 2 834 cm^{-1} 是甲基, 亚甲基, 次甲基等的 C—H 伸缩振动吸收峰, 1 650 cm^{-1} 是 α, β 不饱和酮羰基中 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动吸收峰。

References

- [1] ZHANG Zhi-bin, LIAO Li-fu, WANG Shu-qing, et al (张智彬, 廖力夫, 王淑卿, 等). Acta Zoologica Sinica (动物学报), 2004, 50(3): 341.
- [2] Tang Tao, Li Ping-liang, Luo Lai-xin, et al. Biomed. Chromatogr., 2010, 24(7): 706.

图 3c: HP- β -CD 与 LNG 物理混合物红外光谱图。混合物的红外光谱图为 LNG 红外光谱吸收峰与 HP- β -CD 红外光谱吸收峰的叠加, 而没有产生新的吸收峰。

图 3d: HP- β -CD/LNG 包合物的红外光谱图。炔基氢在 3 268 cm^{-1} 处吸收峰消失了, 这是因为 HP- β -CD 宽而强的 O—H 吸收峰掩盖了 $\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ 吸收峰, 并且 3 400 cm^{-1} 处的 O—H 宽峰变窄, $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动吸收峰移动到 1 657 cm^{-1} 处, 这表明 HP- β -CD 与 LNG 形成包合物, 主要是由于包合物中形成了氢键的作用。

2.4 包合物的紫外稳定性

从图 4 可以看出, 在 UVA 照射下, 50 h 内 LNG 单体降解速度远远超过了其 HP- β -CD 包合物的溶液, 包合物在 50 h 时降解率低于 5%。这说明, 以包合物形式存在的 LNG 紫外稳定性更高, 这可能会提高药物在实际使用中的稳定性。不育剂释放到自然界中要面临紫外线照射降解降低药效的问题, 缓解紫外线照射的降解可减少毒饵中 LNG 的损耗, 从而减缓药物失效时间。

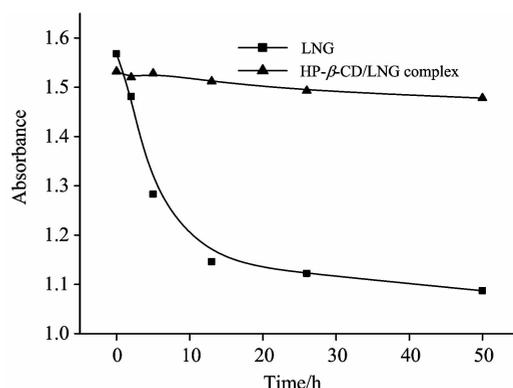


Fig. 4 The degradation rate of monomer and inclusion complex of levonorgestrel with HPCD under UV (WL = 365 nm)

3 结 论

(1) 本文建立了对 LNG 进行定量测定的紫外光谱方法; (2) 采用相溶解度法证明了本实验中 HP- β -CD 与 LNG 形成 1:1 的包合物, 并通过热力学方法计算出了包合物的稳定常数; (3) 采用 IR 光谱对制备的包合物进行了表征, 结果说明包合物的形成与氢键存在着重要的关系; 采用 UV 光谱对包合物的溶液进行了扫描, 证明了包合物的形成, 并确定了包合物可以采用 LNG 的测试方法及标准曲线进行定量; (4) 对 LNG 与其包合物的抗紫外光降解性能进行了测试, 在 50 h 内包合物的紫外稳定性要远高于 LNG 药物单体。这些结果为 LNG 精确定量的理论研究和实际应用提供了基础数据, 具有一定的实际意义。

- [3] Editorial Committee of the Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典编委会编). The Pharmacopoeia of the People's Republic of China(Part II)中华人民共和国药典第二部). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2005, 83.
- [4] HUO Xiu-fang, SHI Da-zhao, WANG Deng(霍秀芳, 施大钊, 王 登). J. Plant Protection(植物保护学报), 2007, 34(3): 321.
- [5] Liu Y, Chen G S, Chen Y, et al. Bioorg. Med. Chem., 2005, 13: 4037.
- [6] Challa R, Ahuja A, All J, et al. AAPS. Pharm. Sci. Tech., 2005, 6(2): 329.
- [7] Qu Q, Tucker E, Christian S D. J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem., 2002, 43(3-4): 213.
- [8] ZHANG Yi-min, ZHANG Zi-fei, ZHOU Qin, et al(张毅民, 张志飞, 周 琴, 等). Chinese J. Anal. Chem.(分析化学), 2006, 34(5): 713.
- [9] Adriana T, Angela L, Nunzio D, et al. Int. J. Pharm., 2005, 295(1-2): 163.
- [10] Jun S, Kim M, Kim J, et al. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2007, 66: 413.
- [11] Manosroi J, Apriyani M G, Foe K, et al. Int. J. Pharm., 2005, 293: 235.
- [12] Yuan Chao, Jin Zhengyu, Xu Xueming, et al. Food. Chem., 2008, 109: 264.
- [13] Yang Bao, Lin Jun, Chen Yong, et al. Bioorgan. Med. Chem., 2009, 17(17): 6311.
- [14] Setlow R. Proc. Natl. Acad. Sci., 1974, 71: 3363.
- [15] D'Angelo S, Ingrosso D, Perfetto B, et al. Free. Radical. Bio. Med., 2001, 31(1): 1.
- [16] Higuchi T, Connors K A. Adv. Anal. Chem. Instr., 1965, 4: 212.
- [17] Brewster M E, Simphins J M, Hora M S. J. Parent. Sci. Tech., 1989, 43: 231.
- [18] SHUANG Shao-min, PAN Jing-hao, GUO Si-yuan, et al(双少敏, 潘景浩, 郭四元, 等). Chin. J. Anal. Chem.(分析化学), 1998, 26(5): 564.

The Preparation, Characterization and Ultraviolet Photodegradation of LNG-HP- β -CD

WANG Da-wei^{1,2}, LIU Qi^{3,4}, LIU Ming², LIU Xiao-hui^{1*}

1. Key Laboratory of Weed and Rodent Biology and Management, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China
2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China
3. Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China
4. Key Laboratory of Dryland Farming and Water-Saving Agriculture, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China

Abstract The characteristics of levonorgestrel (LNG), low solubility and the quick degradation under ultraviolet, limited its study and application in rodent contraception. The inclusion complex of hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) with LNG was investigated in present study. The inclusion complex was prepared by solution method and characterized by ultraviolet absorption spectrum and infrared spectrum spectra. And the stability was evaluated by being exposed to ultraviolet. The authors' results showed that the accurate and simple method of quantitative determination for LNG was established by ultraviolet spectrum, the molar ratio of the complex was 1 : 1 calculated from the phase solubility diagram, the stability constant was $187.3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$, and the formation of the inclusion complex was validated by UV-Vis and Fourier transform infrared spectroscopy. Moreover, the degradation rate of the inclusion complex was less than 5%, which was slower than the LNG monomer. The present study indicated that HP- β -CD could be formed inclusion complexes with LNG and the solubility, and stability were obviously enhanced.

Keywords HP- β -CD; LNG; Inclusion complex; UV absorption spectrum; Ultraviolet photodegradation

(Received May 6, 2010; accepted Aug. 8, 2010)

* Corresponding author