

表 1 羟丙基-β-环糊精与羟丙基-β-环糊精包合物的¹H 化学位移 δ(ppm) 及 Δδ(ppm)

	羟丙基-β-环糊精	叶酸羟丙基-β-环糊精包合物	Δδ
H1	0.994	0.996	0.002
H2	3.385	3.337	-0.048
H3	3.442	3.437	-0.005
H4	3.476	3.475	-0.001
H5	3.567	3.566	-0.001
H6	3.716	3.713	-0.003
H7	3.858	3.857	-0.001
H8	4.924	4.922	-0.002
H9	5.102	5.096	-0.006

如图 3 所示,叶酸羟丙基-β-环糊精包合物叶

表 2 叶酸、叶酸羟丙基-β-环糊精包合物质子化学位移 δ(ppm) 及 Δδ(ppm)

项目	H7	H18	H13/15	H10	H12/16	H9	H19	H22	H21
叶酸	8.651	8.132	7.644	6.943	6.638	4.493	4.331	2.46	1.915
叶酸包合物	8.488	7.612	7.500	6.666	6.518	4.240	4.183	2.236	1.906
Δδ	-0.163	-0.52	-0.144	-0.277	-0.12	-0.253	-0.148	-0.224	-0.009

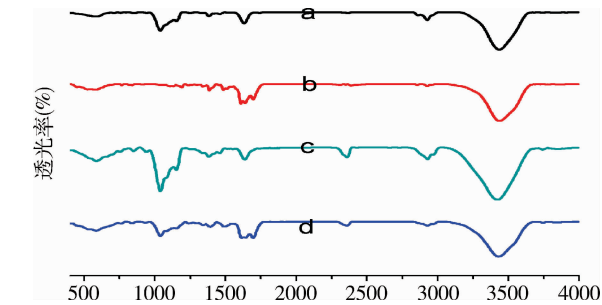


图 3 叶酸羟丙基-β-环糊精的红外光谱图

a. 叶酸羟丙基-β-环糊精包合物;b. 叶酸;c. 羟丙基-β-环糊精;d. 叶酸羟丙基-β-环糊精物理混合物(1:1)

物理混合物的 DSC 曲线基本上再现了叶酸和羟丙基-β-环糊精的各自特征峰,为二者的叠加,但叶酸的吸热峰明显降低。对于叶酸羟丙基-β-环糊精包合物,其 DSC 曲线不存在叶酸的吸热熔化峰,表明叶酸与羟丙基-β-环糊精发生了相互作用,可能形成了包合物。圆二色谱是检测环糊精包合物水溶液的有力手段^[13]。环糊精分子的手性疏水性空腔存在不对称场,非光学活性的疏水性分子叶酸被包合进入该疏水性空腔后,会使其变成具有光学活性的手性分子从而可以观察到诱导 Cotton 效应,表现为具有峰和峰谷的 Cotton 效应曲线。由图 2 可知,叶酸分子无光

酸、羟丙基-β-环糊精与物理混合物的红外光谱亦存在显著不同。

讨 论

已有文献报道,热分析方法可确定在环糊精热分解之前,客分子是否发生熔化、升华、分解、氧化或聚合^[9-12]。由图 1 可知,在加热过程中叶酸首先失去结晶水分子,其 DSC 曲线在约 180℃ 处有一个尖锐的吸热脱水峰,成为无水物;然后在约 210℃ 处发生分子重排,有一较小的分子重排吸热峰。最后发生熔融,在约 250℃ 处为其熔化吸热峰。羟丙基-β-环糊精为无定形物质,在 50~260℃ 范围内几乎看不到吸热峰;叶酸与羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD)(1:1)。

学活性没有圆二色谱带,但在羟丙基-β-环糊精包合中,产生了两个圆二色谱带,在 320nm 波长处有一个由蝶啶环上 N 原子的 n-π 跃迁产生的负 Cotton 效应曲线,在 280nm 波长处有一个由叶酸分子中芳环的 π-π* 跃迁形成的正 Cotton 效应曲线。已有文献报道,圆二色谱谱带与客分子的生色团在环糊精疏水性空腔内的空间位置密切相关^[14]。正的 Cotton 效应曲线表明,叶酸分子的电子偶极矩与羟丙基-β-环糊精疏水性空腔呈轴向平行关系,由本研究结果可知,叶酸分子的蝶啶环是以轴向方式包合进入羟丙基-β-环糊精的疏水性空腔。磁共振氢谱是表征环糊精包合物最直接的手段^[15]。

在包合物中,主客分子之间的相互作用会导致主客分子质子化学位移发生变化。从表 1 数据可见, H1 质子有较大低场化学位移,而 H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9 质子均有较大高场化学位移。从表 2 数据可知,由于羟丙基-β-环糊精的加入,叶酸质子的化学位移 δ 向高场移动。在叶酸羟丙基-β-环糊精包合物中,包合物形成前后羟丙基-β-环糊精质子化学位移的变化是由于叶酸分子中的蝶啶环、苯环和羰基的各向异性共同作用的结果。包合物形成前后,叶酸分子中质子化学位移的改变,说明叶酸

分子被包合进入羟丙基- β -环糊精的疏水性空腔,表明叶酸与羟丙基- β -环糊精形成了包合物。已有研究结果显示^[16],在环糊精包合物中,环糊精的含量较客分子而言占绝对多数,而客分子在环糊精包合物中的含量所占比例甚微,因此,在环糊精包合物的红外光谱中,客分子的红外谱带变化通常会被环糊精的谱带所掩盖,体现不出客分子的红外特征谱带。此外,尽管包合物中环糊精含量占绝对多数,客分子的包入会对主分子羟基之间原先形成的氢键产生影响,表现为包合后,环糊精的羟基特征峰产生红移^[17,18]。图 3 显示,叶酸在 1500~1750/cm 处存在 3 个伸缩振动峰,1695/cm 附近为羧基的 C=O 伸缩振动峰,1637/cm 附近为叶酸分子中酰胺 I 带的 C=O 伸缩振动峰,1608/cm 附近为芳环环内碳-碳伸缩振动,此 3 个峰为叶酸的特征峰。而羟丙基- β -环糊精的特征峰位于 1000/cm 附近为 C-O 伸缩振动峰。物理混合物的红外光谱是叶酸与羟丙基- β -环糊精的叠加。而在包合物的红外光谱中,在 1500~1750/cm 处叶酸的 3 个特征伸缩振动峰消失,表明叶酸分子被包合进入羟丙基- β -环糊精空腔。同时,在 3250~3500/cm 处羟丙基- β -环糊精的 O-H 特征峰由于形成氢键而向长波长方向移动,说明叶酸与羟丙基- β -环糊精形成包合物后,部分位于窄边的羟基形成的氢键受到破坏。

差示扫描量热分析、红外光谱、磁共振光谱、圆二色谱等研究结果一致表明疏水性药物分子可与羟丙基- β -环糊精形成包合物。紫外可见光谱标准工作曲线方程计算结果证明,通过与羟丙基- β -环糊精形成包合物,叶酸在水中的溶解性得到显著提高,1g 包合物中叶酸可达 7.7mg。圆二色谱表征结果证实,非手性疏水性分子与羟丙基- β -环糊精形成包合物后,可以变成具有光学活性的手性分子。磁共振光谱化学位移数据显示,包合物的形成会使主客分子质子的化学位移会发生相应变化。

参考文献

- 1 Singh R, Bharti N, Madan J, *et al.* Characterization of cyclodextrin inclusion complexes[J]. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2010, 2 (3):171-183
- 2 Loftssan T, Brewter ME. Pharmaceutical application of cyclodextrins 1. Solubilization and stabilization[J]. *J Pharm Sci*, 1996, 85(10): 1017-1025
- 3 Rajewski RA, Stella VJ. Pharmaceutical application of cyclodextrins

2. In-vivo[J]. *Drug Delivery J Pharm Sci*, 1996, 85(11):1142-1169
- 4 Duchene D, Vaution C, Glomot F. Cyclodextrin, their value in pharmaceutical Technology[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 1988, 12 (11-13):2193-2215
- 5 Berry RJ, Bailey L, Mulinare J, *et al.* Fortification of flour with folic acid[J]. *Food Nutr Bull*, 2010,31:S22-S35
- 6 Hernandez-Diaz S, Martham PH. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2000, 343(22):1608-1614
- 7 柳时,徐喆,罗智,等. 叶酸偶联壳聚糖纳米粒子的制备[J]. *医药导报*, 2006, 6:561-563
- 8 陶凤,席隆一,邓胜伟,等. 叶酸接枝聚乙二醇化壳聚糖衍生物的合成[J]. *化学研究与应用*, 2010, 22(2):182-185
- 9 Wang L, Jiang X, Xu W *et al.* Complexation of tanshinone IIA with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: effect on aqueous solubility, dissolution rate, and intestinal absorption behavior in rats[J]. *Int J Pharm*, 2007, 341(1-2): 58-67
- 10 Jadhav GS, Vavia PR. Physicochemical, in silico and in vivo evaluation of a danazol- β -cyclodextrin complex[J]. *Int J Pharm*, 2008, 352(1-2): 5-16
- 11 Bencini M, Ranucci E, Ferruti P, *et al.* Preparation and in vitro evaluation of the antiviral activity of the Acyclovir complex of a β -cyclodextrin/poly(amidoamine) copolymer[J]. *J Controlled Release*, 2008, 126(1): 17-25
- 12 Jadhav GS, Vavia PR. Physicochemical, in silico and in vivo evaluation of a Danazol- β -cyclodextrin complex[J]. *Int J Pharm*, 2008, 352(1-2): 5-16
- 13 Bekers O, Uijtendaal EV, Beijnen JH, *et al.* Cyclodextrins in the pharmaceutical field[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 1991, 17(11): 1503-1549
- 14 Franco C, Schwingel L, Lula I, *et al.* Sinisterra and V. L. Bassani. Studies on Coumestrol / β -Cyclodextrin : Inclusion complex characterization[J]. *Int J Pharm*, 2009, 369(1-2): 5-11
- 15 Rao BP, Sarasija S, Narendra C. Physicochemical characterization of Hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexes of rifampicin for improved anti-tubercular activity and stability[J]. *Indian Drugs*, 2006, 43 (8): 679-682
- 16 Chun IK, Yun DS. Inclusion complexation of Hydrocortisone butyrate with cyclodextrins and dimethyl- β -cyclodextrin in aqueous solution and in solid state[J]. *Int J Pharm*, 1993, 96(1-3): 91-103
- 17 Otero-Espinar FJ, Igea AN, Gonzalez NG, *et al.* Interaction of naproxen with β -cyclodextrin in solution and in the solid state[J]. *Int J Pharm*, 1992, 79(2): 149-157
- 18 Lin SY, Kao YH. Solid particulates of drug- β -cyclodextrin inclusion complexes directly prepared by a spray-drying technique[J]. *Int J Pharm*, 1989, 56(3): 249-259

(收稿日期:2013-02-01)

(修回日期:2013-02-28)

叶酸羟丙基- β -环糊精包合物的制备与表征

李海浪 高乾宏 吴国忠 刘新垣

摘 要 **目的** 制备叶酸羟丙基- β -环糊精包合物,以期提高叶酸的溶解性。**方法** 采用溶液搅拌法制备叶酸羟丙基- β -环糊精包合物,利用核磁共振氢谱 ^1H -NMR、红外光谱、圆二色谱和差示量热扫描对包合物进行表征,运用紫外-可见吸收光谱建立标准曲线方程对包合物中的叶酸进行定量。**结果** 物理混合物图谱与包合物图谱存在显著差别。**结论** 通过与羟丙基- β -环糊精(hydroxypropyl- β -cyclodextrin, HP- β -CD)形成包合物,叶酸的溶解性得到显著提高;叶酸被羟丙基- β -环糊精包合后呈现出新的理化特征,表明形成叶酸羟丙基- β -环糊精包合物。

关键词 主分子 客分子 手性分子 差示量热扫描 康顿效应 非极性场 包合物

The Preparation and Characterization of 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin Folate Acid Inclusion Complexes. Li Hailang, Gao Qianhong, Wu Guozhong, Liu Xinyuan. Shanghai Institute of Applied Physical of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

Abstract Objective To prepare the 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin folate acid inclusion compound, expecting to improve the solubility of folate acid. **Methods** Solution stirring method was utilized to prepare the 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin folate acid inclusion complexes. Obtained inclusion complexes were qualified by ^1H -NMR, infrared spectrometry, circular dichroism spectroscopy and DSC, and quantified by standard equation set up by Ultraviolet-Visible Absorption Spectroscopy. **Results** The analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy, infrared spectrometry, circular dichroism spectroscopy and differential scanning calorimetry showed an obvious difference between the inclusion complexes and folate acid. The standard curve equation calculation indicated a great increase in the solubility of folate acid in water. **Conclusion** Hydroxypropyl- β -cyclodextrin could obviously increase the solubility of folate acid. The inclusion complexes showed some new physical characteristics and those results obtained demonstrated the inclusion complexes were formed.

Key words Host molecule; Guest molecule; Chiral molecule; Differential scanning calorimeter; Cotton effect; Nonpolar field; Inclusion complexes

环糊精(cyclodextrin, CD),是一种以 α -1,4-糖苷键相连结合而成的环状多糖。环糊精家族主要有 α -环糊精、 β -环糊精、 γ -环糊精3种,分别由6、7、8个葡萄糖结构单元组成,呈圆台状排列,其中,与伯碳相连接的羟基分布在圆台的上面而与仲碳相连接的羟基则在圆台的底面,在环糊精分子结构中,葡萄糖单元的羟基均位于圆台结构的外面,因此圆台外围呈亲水性,而圆台内腔则为疏水性^[1]。通过将疏水性分子全部或部分填入疏水性空腔,环糊精可与许多疏水性药物形成包合物,从而提高疏水性药物的水溶性^[2,3]。当客分子被包合进入环糊精疏水性空腔时,客分子的理化性质将发生变化,包合前后客分子理化性质的变化可为证实

包合物是否形成提供有效的表征手段^[4]。叶酸是人体不可或缺的水溶性的维生素^[5]。研究表明,叶酸在降低胎儿心脑血管缺陷以及唇裂风险等方面具有重要作用^[6]。然而,叶酸在水中的溶解度很小,室温下在水中的溶解度仅为 $1.6 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$ 。亲水性的羟丙基- β -环糊精可以改善疏水性药物的溶解性,从而提高疏水性药物通过生物屏障的吸收率。本研究通过疏水相互作用的自组装机理,将叶酸包合进入羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)的疏水性空腔,以期改善叶酸的水溶性。

材料与方法

1. 材料:叶酸(FA, 98%, Sigma-Aldrich);羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD, 珠海金浓霖化工科技有限公司);透析袋[截留分子量(MW) = 500 ~ 1000, 上海源叶生物科技有限公司];一次性针头式过滤器(0.22 μm , Millipore公司)。FT-IR800型红外光谱仪(Avatar370, 美国尼高力公司);BRUKER磁共振光谱仪;离心机(BECKMAN COULTER, Avanti J-E Centrifuge);差式扫描量热仪(DSC822°, 瑞士 METTLER TO-

作者单位:201800 中国科学院上海应用物理研究所(李海浪、高乾宏、吴国忠);100049 北京,中国科学院大学(李海浪、高乾宏);200031 中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所(刘新垣)

通讯作者:吴国忠,电子邮箱:wuguozechong@sinap.ac.cn

LEDO 公司); U - 3010 Spectrophotometer (日本 HITACHI 公司); 冷冻干燥机 (CHRIST ALPHA 2-4, 德国 Christ 公司); 电子称量仪 (METTLER TOLEDO); 85-2 型恒温磁力搅拌器 (上海司乐仪器有限公司)。

2. 纳米环糊精-叶酸包合物的制备: 准确称取 1g 叶酸与 1g 羟丙基-β-环糊精 (HP-β-CD) 置于 50ml 的三角烧瓶中, 加入去离子水 10ml, 室温下磁力搅拌 72h。混悬液 20000r/min 离心 30min, 上清液用 0.22μm 的一次性针头式过滤器过滤。将滤液装入截留分子量 (MW) = 500 ~ 1000 的透析袋, 在去离子水中透析 72h, 冷冻干燥。

3. 叶酸包封率测定: (1) 标准曲线制备: 精密称取叶酸 11.5mg, 加 pH 值 5.8 的醋酸-醋酸钠缓冲液溶解, 定容至 100ml 容量瓶, 摇匀, 制成 0.115mg/ml 的对照品溶液。分别量取该溶液 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 和 15.0ml 于 50ml 容量瓶中, 并用 pH 值 5.8 的醋酸-醋酸钠缓冲液定容至刻度, 用 pH 值 5.8 的醋酸-醋酸钠缓冲液做空白对照调零, 以 363nm 处的吸收光度值 (A_{363}) 为横坐标, 以样品浓度 ($C, \mu\text{g/ml}$) 为纵坐标, 得到回归方程: $A = 11090C + 0.2001, R^2 = 0.9993$ 。(2) 样品溶液制备: 准确称取叶酸羟丙基-β-环糊精包合物 30mg, 加 pH 值 5.8 的醋酸-醋酸钠缓冲液溶解, 定容至 50ml 容量瓶, 摇匀, 制成 0.6mg/ml 的对照品溶液。(3) 样品含量测定: 取样品溶液 2ml, 置紫外可见分光光度计石英比色皿, 按标准曲线制备的方法在 360nm 处测量吸光度, 平行测量 3 次, 取平均值 A_{360} 。通过标准曲线回归方程计算包合物中叶酸含量^[7,8]。

4. 红外光谱样品处理: 取叶酸、羟丙基-β-环糊精、叶酸羟丙基-β-环糊精物理混合物 (1:1)、叶酸羟丙基-β-环糊精包合物各 0.5 ~ 1.0mg 分别与大约 100mg 干燥的粉末状的 KBr 在光滑的玛瑙研钵中充分研磨混匀。分别用特制的模具, 在 10000 ~ 15000psi 压力下将混合物压成透明的圆片, 在 400 ~ 4000/cm 波数范围扫描各样品透光率。

5. 差示扫描量热样品处理: 取叶酸、羟丙基-β-环糊精、叶酸羟丙基-β-环糊精物理混合物 (1:1)、叶酸羟丙基-β-环糊精包合物各约 10mg 分别置于差示扫描量热仪专用的铝坩埚中, 盖上铝坩埚盖、封口并用针尖在铝盖上插孔。各样品均以 10℃/min 的速度升温, 在 25 ~ 300℃ 范围内进行差示扫描量热测定。

6. 圆二色谱样品处理: (1) 供试品溶液制备: 称取叶酸羟丙基-β-环糊精包合物约 0.4mg, 置于 4ml Eppendorff 管中, 加 4ml 蒸馏水溶解, 用漩涡振荡器混匀; 称取叶酸约 1mg, 置于 20ml 烧杯中, 加蒸馏水 10ml, 室温下磁力搅拌 4h, 20000r/min 离心分离未溶解叶酸, 上清液供圆二色谱用。(2) 用不含叶酸、叶酸羟丙基-β-环糊精包合物的纯蒸馏水为空白对照进行调零, 在 200 ~ 400nm 波长范围分别对叶酸水溶液、叶酸羟丙基-β-环糊精包合物水溶液作圆二色谱扫描。

结 果

差示扫描量热结果显示, 物理混合物、叶酸、叶酸羟丙基-β-环糊精包合物与羟丙基-β-环糊精的曲线明显不同, 见图 1。紫外可见光谱标准工作曲线方程计算结果证明, 通过与羟丙基-β-环糊精形成包合物, 叶酸在水中的溶解性得到显著提高, 1g 包合物中叶酸可达 7.7mg, 与叶酸在室温下的溶解度 $1.6 \times 10^{-3} \text{mg/ml}$ 相比较而言, 溶解性得到显著提高。

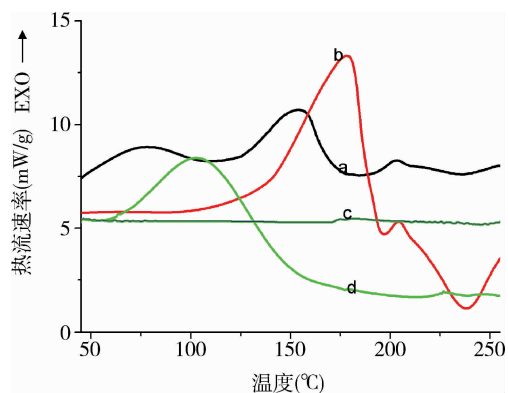


图 1 叶酸环糊精体系的差示扫描量热分析曲线

a. 物理混合物 (1:1); b. 叶酸; c. 叶酸羟丙基-β-环糊精包合物; d. 羟丙基-β-环糊精

叶酸分子无手性没有圆二色谱带, 而叶酸羟丙基-β-环糊精包合物存在明显的圆二色谱带, 二者之间存在显著差异, 见图 2。表 1、表 2 数据表明, 形成包合物前后, 主分子羟丙基-β-环糊精与客分子叶酸各质子的化学位移均发生相应变化。

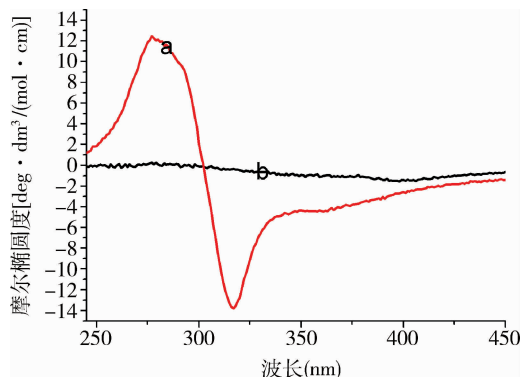


图 2 叶酸羟丙基-β-环糊精体系的圆二色谱曲线

a. 叶酸羟丙基-β-环糊精包合物; b. 叶酸