

• 研究论文 •

基于主客体作用的根皮苷药物可控释放研究

高芳*, 王东明, 丁玮泽, 郑媛洁

(武汉科技大学煤转化与新型炭材料湖北省重点实验室, 武汉 430081)

摘要: 根皮苷在新型药物和天然保健食品开发中具有广泛的应用前景, 因其成分的复杂性和低溶解性, 对根皮苷的研究极具挑战性。本文通过核磁共振、紫外可见光谱及荧光发射光谱等检测手段, 研究了羟丙基- β -环糊精对根皮苷客体的分子识别能力。结果表明, 羟丙基- β -环糊精增强了根皮苷在水中的溶解度, 在水中形成摩尔比为 1 : 1 的主客体络合物, 络合常数为 $2.35 \times 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。羟丙基- β -环糊精的加入造成了根皮苷的荧光猝灭, 金属离子与根皮苷竞争结合羟丙基- β -环糊精会造成包合物的荧光增强, Fe^{3+} 与羟丙基- β -环糊精的键合常数达 $1.52 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 可为根皮苷的药物研究提供理论研究。

关键词: 羟丙基- β -环糊精; 超分子; 根皮苷; 分子识别; 金属离子

Study on Controlled Release of Phloridzin Based on Host-guest Interaction

GAO Fang*, WANG Dong-ming, DING Wei-ze, ZHENG Yuan-jie

(Key Laboratory of Hubei Province for Coal Conversion and New Carbon Materials, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, China)

Abstract: Phloridzin has a wide range of application prospects in the development of new drugs and natural health foods. Due to the complexity and low solubility of its ingredients, the research on phloridzin is extremely challenging. The molecular recognition ability of hydroxypropyl- β -cyclodextrin to phloridzin guest was studied by nuclear magnetic resonance, ultraviolet-visible spectroscopy, fluorescence emission spectroscopy and other detection methods. The results show that hydroxypropyl- β -cyclodextrin enhances the solubility of phloridzin in water, forming a molar ratio of 1 : 1 host-guest complex in water with a complexation constant of $2.35 \times 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. The addition of hydroxypropyl- β -cyclodextrin caused fluorescence quenching of phloridzin, and the competition between metal ions and phloridzin for binding to hydroxypropyl- β -cyclodextrin will cause the fluorescence enhancement of the inclusion complex. The bonding constant between Fe^{3+} and hydroxypropyl- β -cyclodextrin reaches $1.52 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. It can provide theoretical research for the drug research of phloridzin.

Keywords: Hydroxypropyl- β -cyclodextrin; Supramolecular; Phloridzin; Molecular recognition; Metal ions

环糊精呈环状大分子, 是一种由 α -1, 4-葡萄糖苷键连接形成的低聚糖^[1,2]。环糊精由于羟基基团的存在, 使其具有内疏水、外亲水的特殊结构且易于结合客体分子形成超分子体系^[3,4]。在环糊精空腔中加入客体分子, 通过氢键、分子作用力的影响, 能较大提升客体分子的溶解性、稳定性等

性质。因此, 近年来环糊精由于低生产成本、安全无毒等特性被广泛应用于环境、医药和化妆品等领域。其中 β -环糊精以易于分离、高选择性被大量使用, 但由于分子内氢键的形成限制了其在溶液中的溶解性。在 β -环糊精的结构上引入合适的取代基, 使其衍生物既具有母体的空腔结构, 又能

收稿: 2022-07-18; 修回: 2022-08-22

基金项目: 煤转化与新型炭材料湖北省重点实验室开放基金(WKDM201905), 武汉科技大学大学生科技创新基金项目(21ZA036)

作者简介: 高芳(1989-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向为有机合成与分析测试。E-mail: Gaofang0415@wust.edu.cn

doi:10.14028/j.cnki.1003-3726.2023.05.007

改善 β -环糊精的理化性质,在 β -环糊精的众多衍生物中,羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)被认为是最具应用前景的衍生物之一^[5]。羟丙基的引入打破了 β -环糊精的分子内环状氢键,既能提高水溶性,又能使客体分子具有更强的稳定性、低毒性和高选择性。

根皮苷又称根皮甙,属于黄酮类中的二氢查尔酮类物质^[6,7],结构如图 1 所示。根皮苷主要存在于苹果树皮、荔枝果皮和杜梨叶等植物中,具有抗肿瘤、增强记忆力、降低高血糖、抗氧化和抗炎等多种重要的化学活性,在绿色食品、保健品、化妆品和新型药物领域具有广泛的研究前景^[8]。但高含量的根皮苷在水中的溶解性低,口服吸收利用率低,较大程度影响了其使用效果^[9,10]。羟丙基- β -环糊精特殊的空腔结构,能与客体分子形成包合物,从而提高根皮苷的使用性能。目前,国内外对根皮苷的研究主要是其分离提取工艺,关于羟丙基- β -环糊精与其识别性能的研究尚鲜见报道。

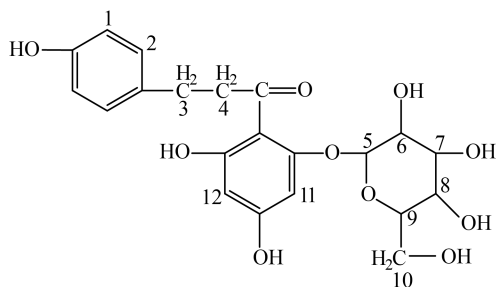


图 1 根皮苷分子结构

Figure 1 Molecule structure of phloridzin

本文通过核磁、紫外和荧光等谱图,利用相互作用谱的灵敏度高、信息强等优点,研究了羟丙基- β -环糊精与根皮苷分子的识别性能,铁离子的加入又会造成根皮苷分子的释放,拓宽了根皮苷药物可控释放研究领域,研究工作具有一定的意义。

1 试剂与仪器

1.1 试剂

羟丙基- β -环糊精(上海源叶生物科技有限公司,含量分数为 98.85%);根皮苷(武汉福鑫化工有限公司,含量分数为 98.85%);氘代重水(分析纯,上海国药科技股份有限公司,氘代度为 99.9%);实验用水均为超纯水。

1.2 仪器

HR-150A 电子天平(上海亚速旺商贸有限公司);Agilent DD2 600 型核磁共振波谱仪(美国

Agilent 公司);UV-1750 紫外-可见光谱仪(日本岛津仪器有限公司);荧光光谱仪(美国 PerkinElmer 公司)。

2 实验方法

2.1 核磁表征及滴定

核磁共振氢谱均采用 5 mm 的核磁管测试,温度设定为 298 K,自动调谐及匀场,弛豫时间为 2 s,扫描次数为 16 次。测试完后用 MestReNova 软件处理数据并作图。

根皮苷样品的制备:称取 5 mg 的固体样品溶于相应的溶剂中,超声或加热使其完全溶解后得 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液待测。HP- β -CD 样品的制备:用移液枪移取适量 HP- β -CD 重水溶液,稀释后得 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液待测。

根皮苷与 HP- β -CD 的核磁滴定:固定根皮苷的浓度为 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,按比例调节 HP- β -CD 浓度,配得不同当量的主客体混合溶液。

2.2 根皮苷与 HP- β -CD 的紫外滴定和 Job's plot 实验

紫外-可见光谱采用 10 mm 光程、容积为 1.2 mL 的微量比色皿。配置 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的根皮苷水溶液,固定根皮苷浓度不变,并将其作为溶剂来配制 HP- β -CD 水溶液,HP- β -CD 的浓度为 $0 \sim 120 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,分别进行紫外-可见光谱测试。测量 200~450 nm 波长范围的吸收光谱。测试温度为 298 K,狭缝宽为 2 nm,扫描速度中速,采样间隔为 1 nm,数据点值到小数点后 4 位,数据收集后导入到 Origin 里作图。

Job's plot 实验:配制了 HP- β -CD 和根皮苷总浓度为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,其中 HP- β -CD 以不同的摩尔分数 X_A 存在,得出其对应浓度下加入和不加入 HP- β -CD 的紫外吸光度的差与 X_A 的乘积。

2.3 根皮苷与金属离子对 HP- β -CD 的荧光滴定

根皮苷-HP- β -CD 的荧光滴定:配置 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的根皮苷水溶液,固定根皮苷浓度不变,并将其作为溶剂来配制 HP- β -CD 水溶液,HP- β -CD 的浓度为 $0 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。根皮苷-HP- β -CD 与金属离子的荧光滴定:根皮苷-HP- β -CD 的浓度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,金属离子溶液浓度为 $0 \sim 160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

荧光光谱均采用 10 mm 光程的标准四通比色皿,测试温度为 298 K。在 200~600 nm 波长范围分别进行荧光光谱测试。扫描速度为中速,采样间隔为 0.5 nm/s。数据点值保留到小数点后 4 位,数据收集后导入到 Origin 里作图。

3 结果与分析

3.1 根皮苷与 HP-β-CD 的核磁表征及滴定

如图 2,根皮苷的羟基上的活泼氢在重水中不出峰,特征峰化学位移 $\delta = 7.019, 6.692, 6.097, 5.965, 5.109, 2.798$, 分别对应 $C_2\text{-H}, C_1\text{-H}, C_{11}\text{-H}, C_{12}\text{-H}, C_5\text{-H}$ 和 $C_4\text{-H}$ 。 $\delta = 3.198 \sim 3.832$ 对应 $C_3\text{-H}, C_6\text{-H}, C_7\text{-H}, C_8\text{-H}, C_9\text{-H}$ 和 $C_{10}\text{-H}$ (图 1 所标记碳原子的序号)。通过¹H-NMR 的化学位移变化,可以反映出主客体分子间是否形成包合物的简单有效方法。从图 2 中可以看出,包结之后根皮苷氢谱化学位移发生变化,说明根皮苷进入主体羟丙基-β 环糊精的空腔内, $C_{11}\text{-H}$ 和 $C_{12}\text{-H}$ 在空腔外受到主体的去屏蔽作用,使化学位移增大,向低场移动,其余位置氢化学位移减小,向高场移动,受到空腔的屏蔽效应。 $\delta = 2.798$ 处的两个氢原子化学环境不一样,在主体空腔里面的氢向高处移动,在外面的氢向低场移动。主体羟丙基-β 环糊精在包合之后的质子峰的化学位移变化不大,稍向低场移动,通过等物质的量的主客体的核磁氢谱只显示出一组峰,这表明它们之间的络合在核磁时标内是快反应体系,HP-β-CD 与根皮苷具有一定的识别效果。

将客体根皮苷的浓度固定为 3 mmol·L⁻¹,不

断改变主体 HP-β-CD 的浓度,即可得到核磁滴定图谱,如图 3 所示。可以明显地看到,在滴定过程中随着主体浓度的不断增加,根皮苷上的四处质子峰有很明显的化学位移变化,在滴定过程中随着主客体浓度之比从 0 增加到 1 倍,根皮苷上的质子峰有很明显的化学位移变化,当继续增加 HP-β-CD 浓度至 4 倍,根皮苷的化学位移未产生明显变化。滴定结束时, $\delta = 7.019$ 处的质子峰移动到了高场 $\delta = 6.847$ 处,通过非线性最小二乘法曲线拟合^[11],用此处的化学位移计算络合常数为 $2.21 \times 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

3.2 根皮苷与 HP-β-CD 的紫外光谱分析

图 4 为客体分子根皮苷和 HP-β-CD 分子的紫外滴定图谱。图 4 中,根皮苷的标准品的最大吸收峰在 284 nm 处,包合物的最大吸收也是 284 nm,从上向下 HP-β-CD 的浓度依次为 0、6、12、24、30、60 和 120 μmol·L⁻¹,可以看到随着 HP-β-CD 浓度不断增加,包合物紫外光谱的最大吸收峰没有明显的位移,但该波长处的吸收强度呈现下降趋势,最后趋于平稳,说明根皮苷逐步与主体分子进行结合。通过非线性最小二乘法曲线拟合,求得 HP-β-CD 与根皮苷的络合常数为 $2.30 \times 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

Job's plot 实验可以确定根皮苷和 HP-β-CD 的结合比,在选取吸收波长为 284 nm 条件下,进行紫外吸光度的测定。结果经过一系列的处理可以得到图 5。从图 5 观察到,随着 HP-β-CD 浓度的不断增加,吸收光强度差先增加后降低,在 $X_A = 0.5$ 时,出现最大的吸光度变化值,表明根皮苷和 HP-β-CD 以 1 : 1 的键合比形成包合物。

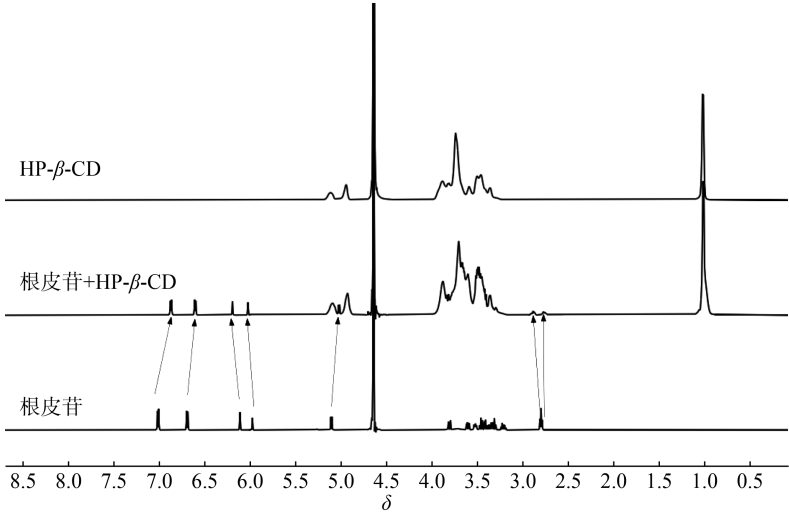


图 2 根皮苷与 HP-β-CD 的核磁氢谱图

Figure 2 ¹H-NMR spectra of phloridzin and HP-β-CD

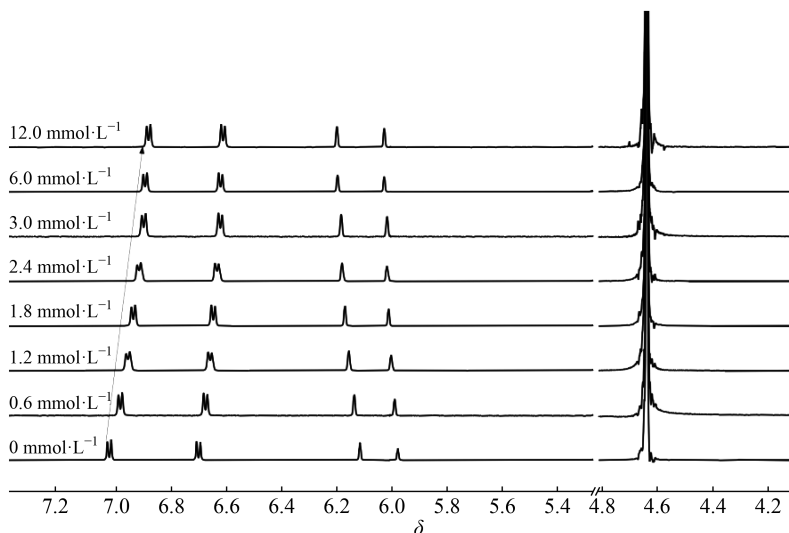


图 3 根皮苷与不同浓度 HP-β-CD 的核磁氢谱图

Figure 3 ^1H -NMR spectra of phloridzin with different concentrations of HP-β-CD

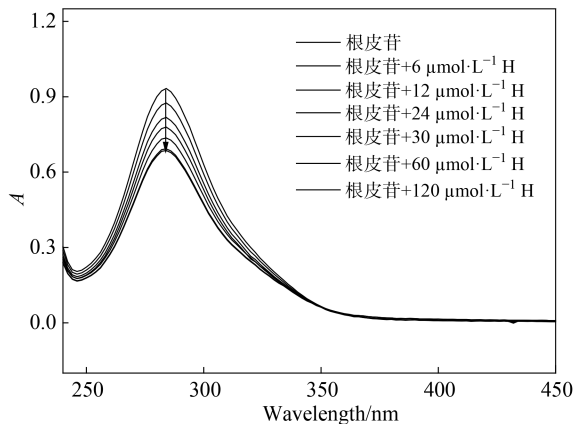


图 4 根皮苷与 HP-β-CD 的紫外滴定图谱

Figure 4 UV-Vis absorption spectra of phloridzin with HP-β-CD

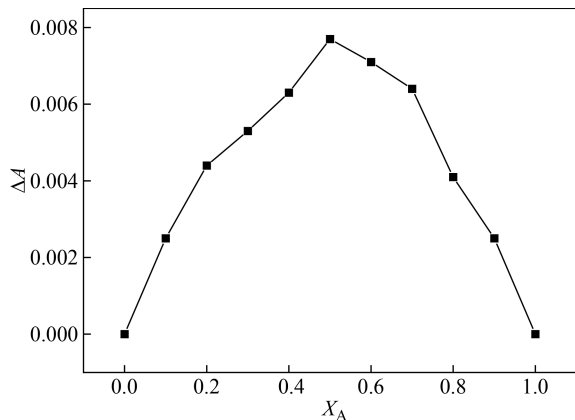


图 5 根皮苷与 HP-β-CD 的 Job's plot 紫外滴定

Figure 5 Job's plot obtained for phloridzin and HP-β-CD

为了进一步研究 HP-β-CD 对根皮苷水溶性的影响,分别配制浓度为 0.010,0.015,0.020,

0.025,0.030 和 0.035 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 根皮苷水溶液,在最大吸收波长 284 nm 处测吸光度值,以根皮苷的浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标作图得标准曲线,如图 6 所示。以吸光度(A)对浓度(c)进行线性回归计算得根皮苷的标准曲线方程为: $A=28.414c-0.0385$, $R=0.9953$ 。通过饱和溶液的方法测定根皮苷和根皮苷/HP-β-CD 包合物在水中的溶解度。将过量的根皮苷和根皮苷/HP-β-CD 包合物分别加入到 2 mL 蒸馏水中,于 25 °C 温度下避光搅拌 24 h。然后用 0.45 μm 的醋酸纤维素膜过滤,在 284 nm 下测量滤液的吸光度,并通过根皮苷标准曲线确定根皮苷的含量。经计算可知,根皮苷的溶解度约 $2.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,根皮苷/HP-β-CD 包合物的水溶性提高至 $13.6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

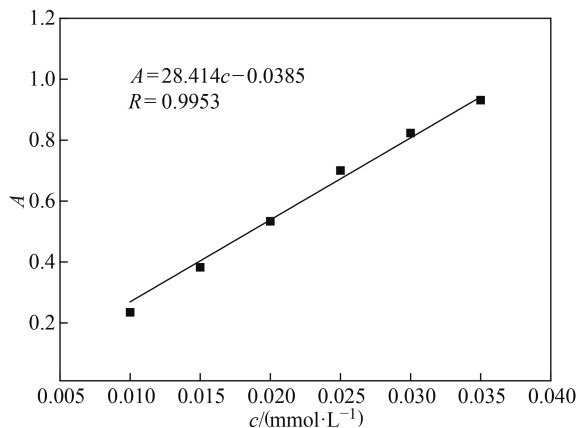


图 6 根皮苷的标准曲线

Figure 6 Standard curve of phloridzin

3.3 根皮苷与金属离子竞争结合 HP-β-CD 的荧光光谱分析

随着 HP-β-CD 摩尔浓度的增加,根皮苷荧光强度逐渐降低,说明 HP-β-CD 的加入对根皮苷的荧光发生淬灭效果(图 7)。当向根皮苷中加入 HP-β-CD 时,根皮苷的荧光降低至 1/4,这主要是由于根皮苷分子进入 HP-β-CD 空腔内后,环糊精内部疏水空腔的极性发生改变,最终造成荧光减弱同时通过荧光滴定实验,使用改进的 Hildebrand-Benesi 方程计算出 HP-β-CD 和根皮苷的结合常数为 $2.35 \times 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,与核磁、紫外滴定计算的结果保持一致。

图 8(a)为根皮苷/HP-β-CD 与 FeCl₃ 的荧光

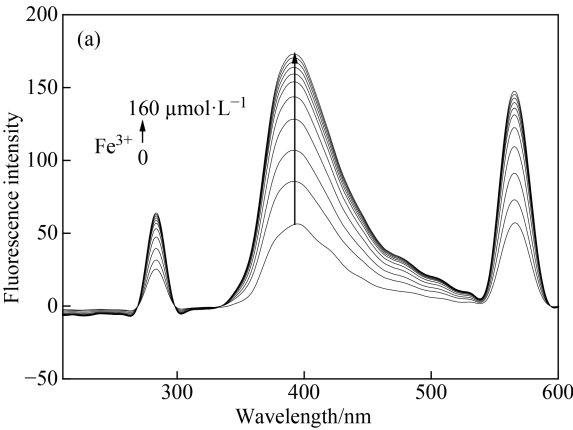


图 8 根皮苷/HP-β-CD 与 Fe³⁺ 的荧光滴定图谱(a)和根皮苷/Fe³⁺ 的荧光滴定图谱(b)

Figure 8 Fluorescence spectra of phloridzin/HP-β-CD with Fe³⁺ (a) and phloridzin/Fe³⁺ (b)

滴定图谱,随着 Fe³⁺ 浓度的增加,根皮苷/HP-β-CD 的荧光强度逐渐增强,Fe³⁺ 的浓度达到根皮苷的 8 倍后,继续加入 Fe³⁺,根皮苷荧光强度增加幅度越来越小,最终趋近于未加 HP-β-CD 时的根皮苷的荧光强度,说明金属阳离子加入引起的荧光强度增强是由于根皮苷的结合基团从 HP-β-CD 的空腔中释放。取 398 nm 处的荧光数据进行作图拟合,拟合时按照 1 : 1 的模式,可以求出 HP-β-CD 与 Fe³⁺ 的键合常数为 $1.52 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。图 8(b)为根皮苷与 Fe³⁺ 的荧光滴定图谱,Fe³⁺ 浓度的增大未使根皮苷的荧光性能产生较大变化,说明根皮苷/HP-β-CD 包结物荧光分子的淬灭,主要是由于 Fe³⁺ 与 HP-β-CD 的结合能力强于根皮苷与 HP-β-CD 的结合能力,从而使得 Fe³⁺ 将根皮苷竞争性地挤出 HP-β-CD 的空腔。

3.4 Fe³⁺ 影响下的根皮苷释放动力学

随着 Fe³⁺ 的加入,根皮苷会在根皮苷/HP-β-

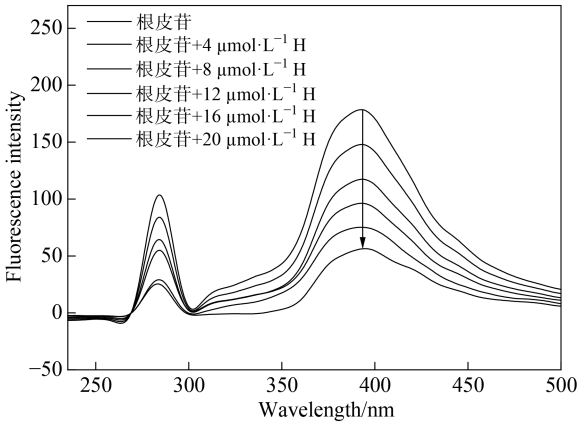
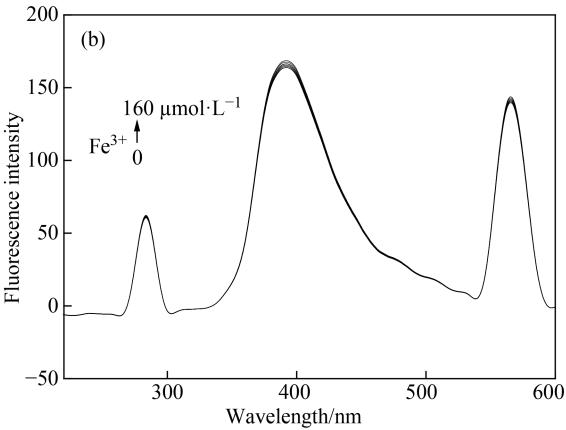


图 7 根皮苷与 HP-β-CD 的荧光滴定图谱

Figure 7 Fluorescence emission spectra of phloridzin with HP-β-CD



CD 包合物中瞬间释放,固定 Fe³⁺ 的浓度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,对于同一个样品,每隔 1 min 测定样品的紫外吸光度,通过吸光度的值拟合得到根皮苷释放动力学,如图 9 所示,其中 A₀ 为未加入 Fe³⁺

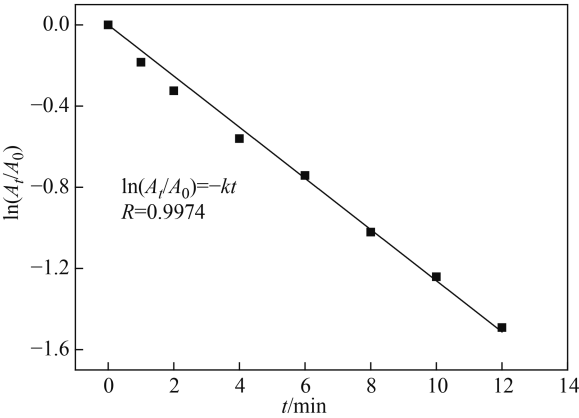


图 9 根皮苷释放动力学

Figure 9 Kinetics of phloridzin release

样品的吸光度值, A_t 为 t 时刻样品的吸光度值, 该反应满足一级反应动力学, 来分析 $\ln(A_t/A_0)$ 与 t 之间的关系, 可求出表观一级速率常数 k 为 0.1260 min^{-1} 。

4 结论

本论文研究了羟丙基- β -环糊精和根皮苷的包合模式, 得到以下结论:

(1) HP- β -CD 对根皮苷具有包结能力, 增大了根皮苷在水中的溶解性, 可形成 1 : 1 的包合物, 同时 HP- β -CD 的存在可以显著减弱根皮苷的荧光强度。

(2) 进一步研究表明根皮苷/HP- β -CD 包合物对金属离子具有响应性。通过金属离子与根皮苷竞争结合 HP- β -CD, 从而引发根皮苷的发射光谱的变化。HP- β -CD 对根皮苷的包结及释放研究, 对进一步研究根皮苷在体内的实际作用具有指导性作用, 也为研究其他口服剂型提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Shimizu, S.; Wada-Hirai, A.; Li, Y. P.; Shimada, Y.; Otsuka, Y.; Goto, S. Relationship between phase solubility diagrams and crystalline structures during dissolution of cimetidine/cyclodextrin complex crystals. *J. Pharm. Sci.*, **2020**, 109(7), 2206-2212.
- [2] Barros, S. D. T.; Duarte, J. P. P.; Rocha, L. D. S.; Ramos, V. S.; Navarro, M. I. R.; Arch-anjo, B. S.; Medeiros, M. E.; de Campos, J. B.; da Costa, M. E. H. M.; Lachter, E. R.; Senra, J. D.; Malta, L. F. B. Cyclodextrin-stabilized palladium nanoparticles on ceria: Investigation of support interactions and pivotal promotion in the suzuki-miyaura reaction. *ChemistrySelect*, **2020**, 5(24), 7227-7235.

- [3] Larsen, D.; Beeren, S. R. Building up cyclodextrins from scratch-templated enzymatic synthesis of cyclodextrins directly from maltose. *Chem. Commun. (Camb)*, **2021**, 57(20), 2503-2506.
- [4] La, Z.; Danel, C.; Grolaux, G.; Charton, J.; Furman, C.; Lipka, E. Electrophoretic separation of multiple chiral center analyte with a three cyclodextrins mixture. *Electrophoresis*, **2021**, 42(17-18), 1810-1817.
- [5] Lu, H.; Gao, M.; Song, R. H.; Ye, L.; Zhang, A. Y.; Feng, Z. G. Hydroxypropyl β -cyclodextrin solubilizing hydrophobic initiator to initiate copper-mediated RDRP of NIPAM in aqueous media. *ChemistrySelect*, **2020**, 5(11), 3385-3390.
- [6] 徐颖, 韩晶晶, 董梅. 苹果根皮苷微胶囊制备. *食品工业*, **2021**, 42(5), 143-147.
- [7] Park, J.; Kwon, O.; Cho, S. Y.; Cho, M. C.; Paick, J. S.; Kim, S. W. Comparison of improving effects for diabetic erectile dysfunction according to the anti-glycemic agents; phlorizin and insulin. *World J. Mens Health*, **2019**, 37(2), 210-218.
- [8] Budama-Kilinc, Y. Fabrication of phloridzin loaded poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles as a wound dressing material candidate for diabetic foot infections. *Sci. Adv. Mater.*, **2019**, 11(5), 738-748.
- [9] 马琮鉴, 高健美, 孔浩, 徐应淑. 根皮苷药理作用研究进展. *医药导报*, **2020**, 39(3), 360-364.
- [10] Gutierrez, B. L.; Zhong, G. Y.; Brown, S. K. Increased phloridzin content associated with russetting in apple (*Malus domestica* (Suckow) Borkh.) fruit. *Genet. Resour. Crop Evol.*, **2018**, 65(8), 2135-2149.
- [11] Thordarson, P. Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40(3), 1305-1323.