

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2017.06.003

5-氟尿嘧啶分子与 β -环糊精包合作用研究*

李兆楼¹ 张波¹ 贾少辉¹ 刘莹^{2▲} 徐香玉³(¹ 济宁医学院基础医学院, 济宁 272067; ² 济宁医学院日照 276826;³ 济宁医学院科研处, 济宁 272067)

摘要 目的 验证 5-氟尿嘧啶分子与 β -环糊精内包合作用, 并测定其包合比、表观解离常数, 提出包合物的可能结构。**方法** 用紫外分光光度法在极稀浓度下测定 5-氟尿嘧啶的吸光度, 考察不同 β -环糊精浓度对 5-氟尿嘧啶吸光度的影响; 运用连续变量法及作图法求包合比和表观解离常数。**结果** 5-氟尿嘧啶的吸光度因 β -环糊精浓度的增大而减小, 确认 β -环糊精对 5-氟尿嘧啶分子发生包合作用; Job's plot 表明: β -环糊精的摩尔分数为 0.5 时, β -环糊精对 5-氟尿嘧啶的吸光度变化影响最大, 说明二者包合摩尔比为 1:1; 包合物的表观解离常数为 7.98×10^{-4} 。**结论** 抗癌药物 5-氟尿嘧啶分子能够全部包合在 β -环糊精空腔之中, 这揭示了两者构成的药物制剂的内部分子间的微结构关系。

关键词 5-氟尿嘧啶; β -环糊精; 包合比; 连续变量法

中图分类号: O656.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2017)12-398-05

Formation of inclusion complexes of β -cyclodextrin with 5-fluorouracil in aqueous solution

LI Zhaolou, ZHANG Bo, JIA Shaohui, LIU Ying, XU Xiangyu

(¹ College of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China; ² Jining Medical University, Rizhao 276826, China; ³ Research Department, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective The purpose of this investigation is to explore the inclusion of β -cyclodextrin with 5-fluorouracil molecules. The apparent dissociation constant and the inclusion ratio of the β -cyclodextrin complexes are determined, and the structure of the inclusion complexes is speculated. **Methods** The absorbance of 5-fluorouracil was measured using UV spectrophotometry in extremely dilute solutions, and the absorption intensity change could suggest the generation of the β -cyclodextrin complexes. Utilizing the continuous variation method, the inclusion ratio and the apparent dissociation constant of the β -cyclodextrin complexes could be measured. **Results** The absorbance of 5-fluorouracil decreased with the increasing of concentration of β -cyclodextrin, suggesting the formation of β -cyclodextrin complexes. The maximal absorbance change of 5-fluorouracil was at the molar fraction of 0.5 in the job's plot, indicating the 1:1 inclusion ratio in inclusion complexes. The apparent dissociation constants of 7.98×10^{-4} was also calculated. **Conclusion** One molecule of 5-fluorouracil can entirely be contained into the β -cyclodextrin molecule cavity. This results reveal the microstructure of 5-fluorouracil with β -cyclodextrin molecule in their pharmaceutical preparation.

Keywords: 5-Fluorouracil; β -Cyclodextrin; Inclusion ratio; Continuous variation Method

5-氟尿嘧啶 (5-Fluorouracil, 5-Fu) 对许多肿瘤

如结肠癌、直肠癌、胃癌、乳腺癌、膀胱癌、卵巢癌、皮肤癌等都具有一定疗效^[1-3], 故研究开发以 β -环糊精 (β -Cyclodextrin, β -CD) 为辅料的 5-Fu 的药物制剂具有重要意义。 β -CD 的大环分子 (图 1) 能够使脂溶性药物的水溶性显著提高^[4]; 尤其是所形

* [基金项目] 济宁医学院博士科研启动基金项目 (JY2015BS25); 济宁市科技计划 (医药卫生) 项目 (2015-53)。

▲ 刘莹, 济宁医学院药学院 2012 级学生

成的 β -CD 包合物对抗癌药物分子具有控释与缓释作用,使其药物制剂相对于原料药具有更高的癌细胞抑制率^[5]。因此,在分子水平上探讨 5-Fu 与 β -CD 分子之间的作用关系,对于研究药物制剂内部微结构以及药物制剂的性质、性能都具有一定的意义。研究 β -CD 与客体分子发生包合作用的物理方法较多,如荧光光谱、圆二色光谱、核磁共振波谱、电化学技术等,本文以紫外可见分光光度法为基础,运用连续变量法^[6-8]进行研究。

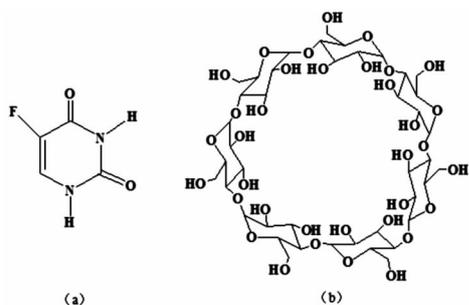


图 1 5-氟尿嘧啶(a)和 β -环糊精(b)的分子结构

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

5-氟尿嘧啶(上海伊卡生物技术有限公司); β -环糊精(天津市光复精细化工研究所);紫外可见分光光度计(UV-2501PC,日本岛津)。

1.2 配制标准溶液

首先配制 5-Fu 的水溶液,再量取不同体积溶液放入各容量瓶中,配成一系列不同浓度的 5-Fu 标准溶液。

1.3 制备包合物

取一定量的 5-Fu 水溶液放入比色管中,然后再向其中加入一定量的 β -CD 水溶液,混合均匀后,于暗处充分反应 24h,备用。

1.4 测定溶液吸光度

在 UV-2501PC 分光光度计上,选取 265nm 波长,测定待测液的吸光度,蒸馏水做参比溶液。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线的绘制

按表 1 中 5-Fu 梯度浓度的顺序,用六支具塞试管取得 C_{5-Fu} 的水溶液样品,选择波长 265nm 处,测取各试管中 5-Fu 的吸光度 A 值。见表 1。

表 1 不同浓度的 5-Fu 水溶液对应的吸光度

序号	$C_{5-Fu}/\text{mol L}^{-1}$	A
1	0	0
2	7.68×10^{-5}	0.595
3	1.54×10^{-4}	1.078
4	2.30×10^{-4}	1.601
5	3.07×10^{-4}	2.152
6	3.84×10^{-4}	2.897

把溶液浓度及其所对应平均吸光度进行回归分析,得到了回归方程 $A = 0.7314C - 0.01938$, $R^2 = 0.9939$,拟合回归方程得到标准曲线。见图 2。

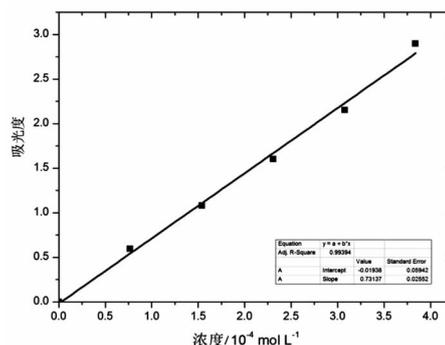
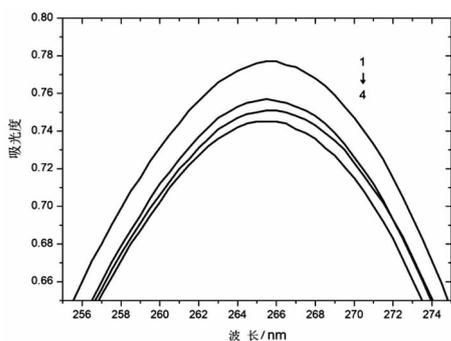


图 2 5-Fu 的紫外吸收的标准曲线

2.2 包合物的形成

为了确定 β -CD 对 5-Fu 分子的包合作用,我们研究了不同浓度的 β -CD 影响下 5-Fu 的紫外吸收情况。保持 5-Fu 的浓度 $1.0 \times 10^{-4} \text{mol L}^{-1}$ 不变,分别加入不同量的 β -CD 形成一系列不同浓度的混合液(暗处保存 24h),测定并对比 265nm 处的最大吸收情况, β -CD 浓度与 5-Fu(aq)的吸光度之间呈负相关,并有红移现象。因为 β -CD 在 220nm 以上没有紫外吸收,故得出结论:随着 β -CD 量的增大,5-Fu 分子相当于经历一个从强极性水溶液到弱极性环境的转变,可归属为形成包合物造成的^[9-10]。其间,5-Fu 客体分子的疏水环结构完全进入 β -CD 分子疏水空腔,脱离了强极性水溶液环境,造成了被包含 5-Fu 分子内 $\pi-\pi^*$ 的跃迁强度降低^[9]。由于 5-Fu 的分子几何形状和尺寸比较适合于 β -CD 分子空腔,其分子的环平面可以与 β -CD 分子圆锥体空腔的轴线平行,可以充分地被包容在 β -CD 分子空腔内。见图 3。



注:1. 无 β -CD; 2. 5.0×10^{-6} ;
3. 5.0×10^{-5} ; 4. $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -CD

图 3 不同浓度 β -CD 下 5-Fu 的紫外吸收图谱

2.3 包合比的测定

由图 3 可知,我们拟用连续变量法^[11-12]求得 β -CD 与 5-Fu 包合物的组成,即包合比。我们配制了一系列浓度的 5-Fu 水溶液,并测定其吸光度 A_0 值(表 2);而后,在 5-Fu 水溶液中加入 β -CD,且使 β -CD 摩尔分数呈单调递增,但两者的总浓度之和(即 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)保持恒定;然后,测量其吸光度,得到一系列对应的 A 值(表 2);最后,以 β -CD 的摩尔分数 $F_{\beta\text{-CD}}$ 作横坐标,以 A 与 A_0 之差(即 ΔA)为纵坐标作图^[11-12],拟合得等摩尔 Job's 图。见图 4。

表 2 5-Fu 和 β -CD 等摩尔连续变量法有关吸光度及其改变量

序号	$C_{5\text{-Fu}}/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	A_0	$C_{\beta\text{-CD}}/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$F_{\beta\text{-CD}}$	A	$A-A_0 = \Delta A$
1	1.0×10^{-4}	0.593	0	0	0.593	0
2	9.0×10^{-5}	0.562	1.0×10^{-5}	0.1	0.552	-0.010
3	8.0×10^{-5}	0.511	2.0×10^{-5}	0.2	0.496	-0.015
4	7.0×10^{-5}	0.489	3.0×10^{-5}	0.3	0.466	-0.023
5	6.0×10^{-5}	0.362	4.0×10^{-5}	0.4	0.335	-0.027
6	5.0×10^{-5}	0.322	5.0×10^{-5}	0.5	0.294	-0.028
7	4.0×10^{-5}	0.283	6.0×10^{-5}	0.6	0.257	-0.026
8	3.0×10^{-5}	0.204	7.0×10^{-5}	0.7	0.181	-0.023
9	2.0×10^{-5}	0.143	8.0×10^{-5}	0.8	0.128	-0.015
10	1.0×10^{-5}	0.073	9.0×10^{-5}	0.9	0.062	-0.011
11	0	0	1.0×10^{-4}	1.0	0	0

表 3 5-Fu 和 β -CD 等摩尔连续变量法中 $(A_0/A-A_0)$ vs. $(1/C_{\beta\text{-CD}})$ 数据

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$1/C_{\beta\text{-CD}}$	1.0×10^5	1.1×10^5	1.3×10^5	1.4×10^5	1.7×10^5	2.0×10^5	2.5×10^5	3.3×10^5	5.0×10^5	1.0×10^6
$A_0/A-A_0$	0	6.64	9.53	8.87	10.88	11.50	13.40	21.26	34.07	56.2

因为 β -CD 的包合作用会使 5-Fu 的吸光度减小,那么,图 4 ΔA 最小值(即吸光度最大改变值)处就是两组分在反应量上实现了最恰当包合,则此处所对应的 β -CD 摩尔分数是 0.5,说明包合物中 β -CD 和 5-Fu 二者组成比为 1:1。

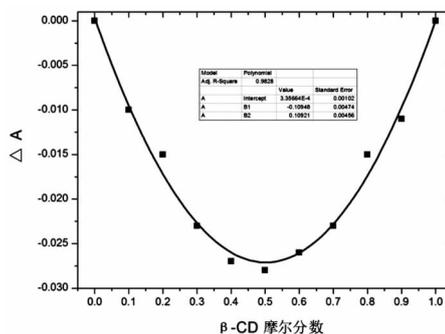


图 4 β -CD 在水溶液中包含 5-Fu 的等摩尔 Job's 图

2.4 包合物的表观解离常数

在连续变量法的基础上,我们可以根据 Benesi-Hildebrand 方程式^[13]求算包合物的表观解离常数(K_d)或稳定常数(K_f),以评估 5-Fu- β -CD 包合物的稳定性。参照相关文献^[9,14],同样地可以建立关于 5-Fu- β -CD 包合物表观解离常数(K_d)的关系式(1):

$$\frac{A_0}{A-A_0} = \frac{\epsilon_{5\text{-Fu}}}{\epsilon_{5\text{-Fu}-\beta\text{-CD}} - \epsilon_{5\text{-Fu}}} + \frac{\epsilon_{5\text{-Fu}}}{\epsilon_{5\text{-Fu}-\beta\text{-CD}} - \epsilon_{5\text{-Fu}}} \times \frac{K_d}{C_{\beta\text{-CD}}} \quad (1)$$

(1) 式中 ϵ 表示摩尔吸光系数。根据关系式(1)可知,以表 2 中的有关数据为基础,可处理得到一系列 $(A_0/A-A_0)$ 的绝对值和 $(1/C_{\beta\text{-CD}})$ 对应的数据(表 3);若以 $1/C_{\beta\text{-CD}}$ 为横坐标,以 $A_0/A-A_0$ 的绝对值为纵坐标作图,即得到一条直线(图 5)。该直线斜率为 5.857×10^{-5} 、截距为 0.073;该直线的斜率与截距二者比值即包合物表观解离常数($K_d = 7.98 \times 10^{-4}$)。从 K_d 值看出,5-Fu 和 β -CD 二者能够存在包合与释放的平衡关系。

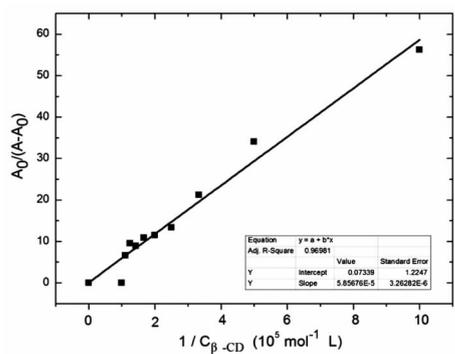


图 5 等摩尔连续变量法 ($A_0/A-A_0$) vs. ($1/C_{\beta-CD}$) 图

2.5 包合物的可能结构

我们(2.3 中)已经求得,5-Fu- β -CD 包合物组成为 1:1。对于 β -CD 分子空腔来说,客体分子的形状、尺寸和极性匹配,是发生包合作用的必要条件^[4,15]。而这些条件对于 5-Fu 分子来说都已具备(2.2 已述),其疏水性的分子环平面可以完全被包容在 β -CD 分子空腔内(图 6),与 β -CD 分子圆锥体的中轴线平行,确保它与 β -CD 分子疏水空腔最大程度的接触;再者,主客体之间的超分子作用如范德华力、氢键作用、偶极作用等也对包合物的结构和弱稳定性具有较大影响^[4,15]。5-Fu 分子的两端的极性基团如羰基 C=O、氟原子—F 等,可能会与 β -CD 分子空腔外口部的羟基—OH 等发生氢键作用和偶极作用等,这也一定程度上稳固了包合物的结构。见图 6。

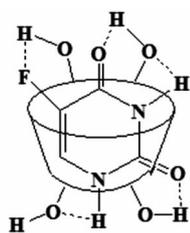


图 6 β -CD-5-Fu 包合物的可能结构示意图

3 结论

研究表明, β -环糊精分子与抗癌药物 5-氟尿嘧啶分子可以形成弱稳定性的包合物,该包合物中 β -环糊精与 5-氟尿嘧啶的组成摩尔比为 1:1,包合物的表观解离常数为 7.98×10^{-4} 。这些结果为进一步研究 β -环糊精为辅料的 5-氟尿嘧啶新型药物制剂,提供了其内部微结构和分子间作用的依据;

同时也表明, β -环糊精分子空腔对 5-氟尿嘧啶分子存在着包合的缓释作用。

参考文献:

- [1] 张红雨,赵春临,叶延伟. 氟尿嘧啶血药浓度监测对于结直肠癌患者化疗疗效的研究进展[J]. 河南医学研究, 2016, 25(2): 260-262. DOI: 10. 3969/j. issn. 1004-437X. 2016. 02. 032.
- [2] 郝永胜,李凤晓,范伟. 进展期胃癌术中植入 5-氟尿嘧啶缓释剂的疗效观察[J]. 中国药物与临床, 2016, 16(4): 558-560. DOI: 10. 11655/zgywylc2016. 04. 042.
- [3] 李雅,王晓梅,韩士田,等. 5-氟尿嘧啶衍生物的抗癌活性研究[J]. 河北工程大学学报(自然科学版), 2008, 25(1): 92-95. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-9469. 2008. 01. 025.
- [4] 童林荟. 环糊精化学:基础与应用[M]. 北京:科学出版社, 2001: 373-377.
- [5] Sun T, Guo Q, Zhang C, et al. Self-assembled vesicles prepared from amphiphilic cyclodextrins as drug carriers[J]. Langmuir, 2012, 28(23): 8625-8636. DOI: 10. 1021/la301497t.
- [6] Gil V MS, Oliveira NC. On the use of the method of continuous variations [J]. Journal of Chemical Education, 1990, 67(6): 473. DOI: 10. 1021/ed067p473.
- [7] Renny JS, Tomasevich LL, Tallmadge EH, et al. Method of continuous variations: applications of job plots to the study of molecular associations in organometallic chemistry [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2013, 52(46): 11998-12013. DOI: 10. 1002/anie. 201304157.
- [8] MacCarthy P. Simplified experimental route for obtaining Job's curves [J]. Analytical Chemistry, 1978, 50(14): 2165-2165. DOI: 10. 1021/ac50036a059.
- [9] Dang XJ, Nie MY, Tong J, et al. Inclusion of the parent molecules of some drugs with β -cyclodextrin studied by electrochemical and spectrometric methods [J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1998, 448(1): 61-67. DOI: 10. 1016/s0022-0728(97)00516-0.
- [10] Smith VK, Ndou TT, Warner I M. Spectroscopic Study of the Interaction of Catechin with α -, β -, and γ -Cyclodextrins [J]. The Journal of Physical Chemistry, 1994, 98(35): 8627-8631. DOI: 10. 1021/j100086a007.

(下转第 406 页)

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2017.06.004

艾灸对脑缺血-再灌注损伤大鼠 MMP-9 表达的影响*

郑桂芝¹ 梁汝庆² 郑灿磊¹ 于斌¹ 孙闵¹ 孙冰¹

(¹ 济宁医学院中西医结合学院, 济宁 272067; ² 济宁医学院附属医院, 济宁 272029)

摘要 目的 观察艾灸对脑缺血-再灌注损伤大鼠血清 MMP-9 含量的影响。方法 将 SD 大鼠随机分为模型组、艾灸组和假手术组, 每组 15 只, 神经行为学评分评判造模以及不同时间点艾灸干预神经功能恢复情况, ELISA 检测血清 MMP-9 含量, Western Blot 检测脑组织中 MMP-9 表达。结果 艾灸干预后, 艾灸组神经功能缺损评分较模型组明显降低 ($P < 0.05$); 艾灸组血清 MMP-9 含量和脑组织 MMP-9 表达较模型组明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 艾灸对脑缺血-再灌注损伤大鼠神经功能有显著改善作用, 其机制可能是通过调节血清和脑组织 MMP-9 表达量的变化, 从而保护血管内皮细胞损伤。

关键词 艾灸; 脑缺血-再灌注损伤; 基质蛋白酶 9

中图分类号: R245 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2017)12-402-05

Effect of moxibustion on MMP-9 expression in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury

ZHENG Guizhi¹, LIANG Ruqing², YU Bin¹, ZHENG Canlei¹, SUN Min¹, SUN Bing¹

(¹ College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine of Jining Medical University, Jining 272067, China;

² Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China)

Abstract: Objective To observe the effect of moxibustion on the expression of MMP-9 in cerebral ischemia-reperfusion injury rats. **Methods** SD rats were divided into model group, moxibustion group and Sham-operation group randomly ($n = 15$). Neurobehavioral score was used to evaluate the situation of modeling. After moxibustion, the recovery of nerve function at different time points, the content of MMP-9 in serum were detected by ELISA, and the expression of MMP-9 in brain tissue was detected by Western Blot. **Results** After moxibustion, the neurological score in moxibustion group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$). The MMP-9 expression in serum and brain tissue in the moxibustion group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Moxibustion can significantly improve neurological function in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury. The mechanism may be the protection of vascular endothelial cell injury by changing the expression of MMP-9 in serum and brain tissue.

Keywords: Moxibustion; Cerebral ischemia-reperfusion injury; Matrix metalloproteinase-9

脑血管疾病是目前严重威胁人类健康和生命的主要疾病, 其中缺血性脑血管病约占全部脑血管疾病患者的 80%。临床大多由大脑中动脉阻塞引起急性血液循环障碍, 导致突发性局灶性功能障碍, 引起感觉、运动功能减退或丧失, 甚至死亡, 是

神经内科常见病和多发病, 具有高发病率、高死亡率、高致残率、高复发率的特点。研究表明^[1-2], 缺血性脑血管病的发生有许多炎症因子参与, 其中基质金属蛋白酶类 (matrix metalloproteinases, MMPs) 尤其是基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 的升高, 对血管内皮细胞损伤性增强, 从而导致缺血性脑病的发生。血管内皮细胞损伤是其共同的病理基础。中医认为本病发病的基本病机是本虚标实, 风、火、

* [基金项目] 山东省中西医结合临床重点学科资助项目; 济宁医学院青年基金资助 (JYQ2011KM046)