

β-环糊精对甲氨蝶呤的包合作用*

周 静¹▲ 李兆楼²▲ 陈昌琳¹▲ 刘 莹¹▲ 李琳琳¹▲

(¹ 济宁医学院; ² 济宁医学院基础医学院, 济宁 272067)

摘 要 目的 研究 β-环糊精大环分子对甲氨蝶呤分子的包合作用,测定其化学组成包合比、表观解离常数,并提出包合物可能的结构模型。**方法** 利用紫外分光光度法测定甲氨蝶呤稀溶液吸光度,根据吸收强度变化来确定包合物形成。利用连续变量法(Job's plot)测定其摩尔包合比、表观解离常数等。**结果** 研究表明,甲氨蝶呤的吸光度随着 β-环糊精浓度的增大而增大,二者能够形成包合物;Job's plot 也表明,甲氨蝶呤最大的吸光度变化值对应的 β-环糊精摩尔分数为 0.5,故甲氨蝶呤能够与 β-环糊精形成组成为 1:1 的包合物,包合物的表观解离常数为 1.30×10^{-5} 。**结论** 抗癌药物甲氨蝶呤可与大环分子 β-环糊精发生包合作用,甲氨蝶呤分子的一部分可被包合在环糊精分子空腔中。对于进一步研究以 β-环糊精为辅料的甲氨蝶呤药物制剂的内部微结构和性质、性能具有意义。

关键词 甲氨蝶呤;β-环糊精;连续变量法;包合摩尔比

中图分类号:O656.9 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2016)10-357-05

Inclusion complexes of β - cyclodextrin with methotrexate

ZHOU Jing¹, LI Zhaolou², CHEN Changlin¹, LIU Ying¹, LI Linlin¹

(¹ Jining Medical University; ² School of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective The goal of present study is to confirm the formation of the inclusion complexes of β-cyclodextrin with methotrexate molecules. The inclusion molar ratio and the apparent dissociation constant of the β-cyclodextrin complexes are explored, and the possible structure of the inclusion complexes is proposed. **Methods** The UV absorbances of methotrexate were measured by spectrophotometry in dilute concentrations, and the formation of the β-cyclodextrin complexes was determined according to the absorption intensity change. The inclusion molar ratio and the apparent dissociation constant of the β-cyclodextrin complexes were obtained using the continuous variation method (Job's plot). **Results** The absorbance of methotrexate increased with the addition of β-cyclodextrin. This result suggests formation of the inclusion complexes. The maximum absorbance changes existed at the point of β-cyclodextrin molar fraction of 0.5 on job's plot, indicating that β-cyclodextrin complexes was formed in inclusion molar ratio of 1:1. The apparent dissociation constants of the conclusion complexes was 1.30×10^{-5} . **Conclusion** A methotrexate molecule can partly be contained into the cavity of β-cyclodextrin macrocyclic molecule in the inclusion complexes. These results showed the significance for further studying the microstructure and properties of pharmaceutical preparations constructed by β-cyclodextrin and methotrexate molecules.

Keywords: Methotrexate; β-Cyclodextrin; Continuous variation method; Inclusion molar ratio

* [基金项目] 济宁医学院大学生科研项目(2015-06); 济宁市科技计划(医药卫生)项目(2015-53)

△ [通信作者] 李兆楼, E-mail: jnzhaolou@mail.jnmc.edu.cn

▲ 刘莹, 济宁医学院药学院 2012 级学生

▲ 陈昌琳, 李琳琳, 济宁医学院临床医学院 2013 级学生

▲ 周静, 济宁医学院精神卫生学院 2014 级学生

甲氨蝶呤(Methotrexate, MTX)作为二氢叶酸还原酶抑制剂,在临床上不仅对白血病有效,而且对实体瘤如头颈部癌、骨肉瘤等都有良好疗效^[1-2],也是重要的抗风湿药物之一。人们试图开发各种 MTX 的新型药物制剂如凝胶剂等^[3],本课题组拟开发 β-环糊精(β-Cyclodextrin, β-CD)为辅

料的 MTX 的新型药物制剂,需要深入研究制剂内部 β -CD 分子与 MTX 的相互作用关系。 β -CD 为辅料的新型药物制剂的优点在于, β -CD 分子的大环空腔(图 1)可以全部或部分地包合大多数药物分子,故能增大脂溶性药物的溶解度,且具有一定稳定性而无毒副作用^[4];特别是 β -CD 包合物对抗癌药物分子有控释与缓释的作用,新型药物制剂可提高对癌细胞的抑制率^[5]。因此,我们研究 β -CD 分子与 MTX 的包合作用,采用紫外可见分光光度法、连续变量法^[6-8]探讨 β -CD 与 MTX 包合物的组成比,利用数学推导及作图法求算包合物表观解离常数,以说明包合物的稳定性等情况。为深入研究 β -CD 辅料的 MTX 药物制剂的性质、性能等,提供其内部微结构和分子间作用关系等基本参考数据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

MTX 原料药(北京亚希尔化学制品有限公司)、MTX 标准品(中国药品生物制品检定所)、 β -环糊精(天津市科密欧化学试剂有限公司),其他试剂均为分析纯;紫外可见分光光度计(UV-2501PC,日本岛津)。

1.2 标准溶液配制

称取一定质量的 MTX 标准品,加入一定体积的 NaOH 溶液(1.0×10^{-2} mol/L)在烧杯中溶解,然后转移至容量瓶中,以 NaOH 稀溶液定容。再分别量取不同体积溶液转移到各容量瓶中,配成一系列不同浓度的 MTX 标准溶液。

1.3 包合物的制备

量取一定体积一定浓度的 MTX 水溶液于纳氏比色管中,再加入一定体积一定浓度的 β -CD 水溶液混合均匀,避光保存 24h,待测。

1.4 溶液吸光度测定

以 1cm 厚度的比色皿取一定浓度的待测液,NaOH 稀溶液做参比溶液,使用 UV-2501PC 在 302nm 处测定其吸光度。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线的绘制

取 6 支具塞试管,按表 1 中 MTX 的一系列浓度 C_{MTX} 的水溶液取样,在波长 302nm 处测得不同浓度试管中 MTX 对应的吸光度 A 值。见表 1。

表 1 不同浓度的 MTX 水溶液对应的吸光度

序号	$C_{MTX}/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	A
1	0	0
2	8.80×10^{-6}	0.198
3	1.76×10^{-5}	0.401
4	2.64×10^{-5}	0.617
5	3.52×10^{-5}	0.831
6	4.40×10^{-5}	1.051

将溶液浓度和对应的平均吸光度进行回归分析,得到回归方程 $A = 0.2392C - 0.0101$, $R^2 = 0.9995$,将回归方程拟合得到标准曲线(图 1)。表明 MTX 在一定浓度范围内其浓度与吸光度 A 呈线性关系。

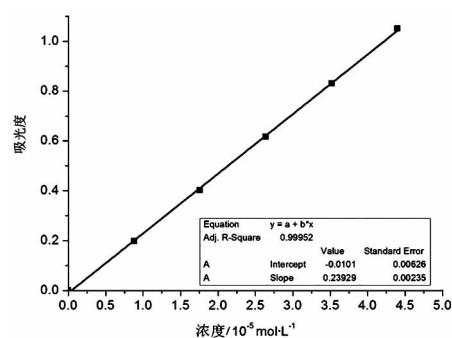
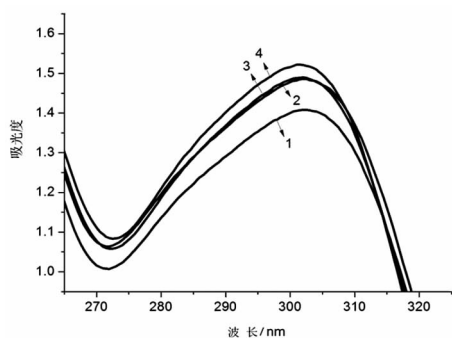


图 1 MTX 的紫外吸收的标准曲线

2.2 包合物的形成

考察 β -CD 对 MTX 紫外吸收产生的影响,可以确定 β -CD 与 MTX 分子之间的包合作用。我们配制一系列固定浓度 1.0×10^{-4} mol/L 的 MTX 溶液,加入不同浓度的 β -CD 形成一系列混合液,混匀避光保存 24h 后,比较在波长 302nm 处的最大吸收情况。见图 2。



注:1. 无 β -CD;2. 5.0×10^{-6} ;3. 5.0×10^{-5} ;
4. 1.0×10^{-4} mol/L β -CD

图 2 不同浓度 β -CD 下的 MTX(1.0×10^{-4} mol/L)的紫外吸收图谱

由图 2 可知,随着 β -CD 浓度的增大,MTX 水溶液的吸光度逐渐增大,且伴有蓝移趋势。由于 β -CD 在波长 220nm 以上无吸收,所以,上述变化现象表明,随着 β -CD 的加入,MTX 分子一端的蝶啶环结构可能部分进入了 β -CD 分子空腔,空腔内的高电子云密度造成了蝶啶环的对称性降低,使 MTX 分子内 π - π^* 的跃迁强度增大^[9-12]。因而,可以合理地确认,MTX 客体分子的部分结构与 β -CD 分子空腔发生了包合作用。包合作用对 MTX 在水溶液中的溶解度有促进作用。

2.3 包合比的测定

确定 β -CD 与 MTX 包合物的包合比,采用连续变量法^[10,13]进行测定并作图求之。首先,配制一系列不同浓度的 MTX 水溶液,并测定其一系列吸光度 A_0 值(表 2);而后在 MTX 系列溶液中加入一定量 β -CD,使一系列溶液中的 β -CD 摩尔分数呈递增变化趋势,而 MTX 和 β -CD 二者总浓度之和(即 1.0×10^{-4} mol/L)保持不变,测其吸光度,得到对应的一系列 A 值(表 2);以 β -CD 的摩尔分数 $F_{\beta\text{-CD}}$ 为横坐标,以所对应的 ΔA 即 $(A-A_0)$ 值为纵坐标作图,拟合得到一条曲线(图 3),即等摩尔 Job's 图^[10-13]。

表 2 MTX 和 β -CD 等摩尔连续变量法 对应的吸光度及其改变量						
序号	$C_{\text{MTX}}/\text{mol/L}$	A_0	$C_{\beta\text{-CD}}/\text{mol/L}$	$F_{\beta\text{-CD}}$	A	$\Delta A = A-A_0$
1	1.0×10^{-4}	1.914	0	0	1.914	0
2	9.0×10^{-5}	1.793	1.0×10^{-5}	0.1	1.807	0.014
3	8.0×10^{-5}	1.521	2.0×10^{-5}	0.2	1.544	0.023
4	7.0×10^{-5}	1.317	3.0×10^{-5}	0.3	1.349	0.032
5	6.0×10^{-5}	1.135	4.0×10^{-5}	0.4	1.175	0.04
6	5.0×10^{-5}	0.939	5.0×10^{-5}	0.5	0.981	0.042
7	4.0×10^{-5}	0.762	6.0×10^{-5}	0.6	0.802	0.04
8	3.0×10^{-5}	0.609	7.0×10^{-5}	0.7	0.645	0.036
9	2.0×10^{-5}	0.426	8.0×10^{-5}	0.8	0.448	0.022
10	1.0×10^{-5}	0.183	9.0×10^{-5}	0.9	0.197	0.014
11	0	0	1.0×10^{-4}	1.0	0	0

表 3 MTX 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	14.07	20.36	20.05	23.35	29.375	29.38	42.16	67.13	129.07

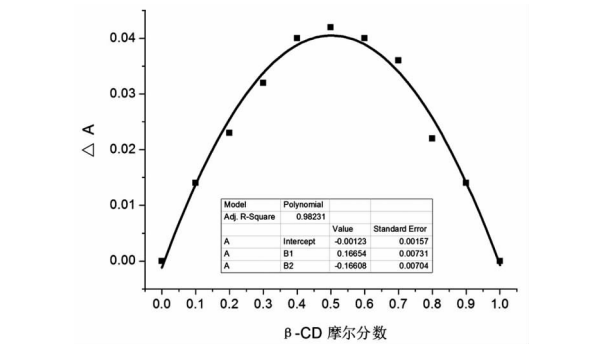


图 3 水溶液中的 β -CD 和 MTX 等摩尔 Job's 图

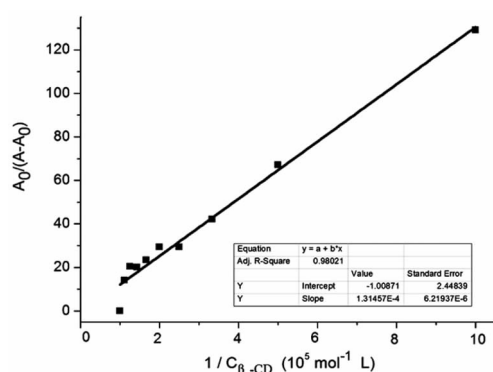
由于加入 β -CD 后的包合作用会使 MTX 的吸光度增大,那么曲线上 ΔA 最大值(即吸光度改变的最大值)表明两者在量的方面实现了最充分的包合,此处所对应的 β -CD 摩尔分数即表明了包合物的组成。由图 3 可以看出,曲线上 ΔA 最大值对应的 β -CD 摩尔分数是 0.5,表明所形成的包合物组成比为 1:1。

2.4 包合物的表观解离常数

求算出包合物表观解离常数(K_d)或稳定常数(K_f),可以评价 MTX- β -CD 包合物的稳定性。一般参照 Benesi-Hildebrand 方程式^[14],在连续变量法(见 2.3)的基础上可以求算。相关文献推导出关系式(5)^[9]和关系式(9)^[15]等,我们同样可以建立关于 MTX- β -CD 包合物表观解离常数(K_d)的关系式(1),式中 ε 代表摩尔吸光系数。

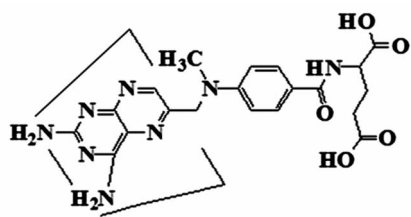
$$\frac{A_0}{A-A_0} = \frac{\varepsilon_{\text{MTX}}}{\varepsilon_{\text{MTX-}\beta\text{-CD}} - \varepsilon_{\text{MTX}}} + \frac{\varepsilon_{\text{MTX}}}{\varepsilon_{\text{MTX-}\beta\text{-CD}} - \varepsilon_{\text{MTX}}} \times \frac{K_d}{C_{\beta\text{-CD}}} \quad (1)$$

对表 2 中的有关数据处理,可得到一系列 $(A_0/A-A_0)$ 绝对值与 $(1/C_{\beta\text{-CD}})$ 对应的数据(表 3);如果以 $1/C_{\beta\text{-CD}}$ 为横坐标、 $A_0/A-A_0$ 值为纵坐标作图,回归拟合分析后得到一条直线(图 4),该直线斜率(1.3146×10^{-5})与截距(1.0087)的比值,即包合物表观解离常数 $K_d = 1.30 \times 10^{-5}$ 。 K_d 值的大小表明,MTX- β -CD 包合物具有一定的稳定性,存在包合与解离的平衡关系,表明 β -CD 辅料的药物制剂对 MTX 分子有控释与缓释作用。

图4 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

客体分子能够被 β -CD 分子空腔发生包合的必要条件是,客体分子的几何形状、尺寸和极性必须与之相互匹配^[16-17]。MTX 分子是长链形状分子,它的一端具有疏水性的蝶啶环结构,另一端是亲水的谷氨酸结构。 β -CD 分子的疏水性空腔更容易接受疏水性的蝶啶环,而不易包容亲水性的谷氨酸结构。我们已经知道,MTX- β -CD 包合物组成比为 1:1。 β -CD 分子可能部分地包含 MTX 分子的蝶啶环(图 5)。MTX 分子长链也可能弯折使谷氨酸结构部分与 β -CD 分子空腔口的羟基(—OH)等基团发生超分子作用如范德华力、氢键、偶极作用等,对稳定包合物的结构产生一定影响^[16-17]。

图5 MTX- β -CD 包合物的可能结构示意图

3 结论

β -环糊精分子与抗癌药物 MTX 分子能够形成具有一定稳定性的包合物,包合物的组成比为 1:1,包合物的表观解离常数为 1.30×10^{-5} 。这为深入研究 β -环糊精为辅料的 MTX 新型药物制剂,提供其内部微结构和分子间作用关系等基本数据,尤其为 β -环糊精与药物分子能够产生控释与缓释作用提供了结构性佐证。

参考文献:

- [1] 梅升辉,杨莉,赵明,等. HPLC-MS/MS 法测定人血浆中甲氨蝶呤浓度的不确定度评定[J]. 中南药学, 2016, 14(2): 117-122.
- [2] 张爱梅,王怀生,罗玉会. 甲氨蝶呤与 DNA 相互作用的荧光光谱研究[J]. 分析测试学报, 2008, 27(1): 45-48.
- [3] 王雪明,冯端浩,李俊山,等. 甲氨蝶呤凝胶的制备及质量控制[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(8): 631-632.
- [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] 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.
- [10] Song LX, Wang HM, Guo XQ, et al. A comparative study on the binding behaviors of β -cyclodextrin and its two derivatives to four fanlike organic guests[J]. Journal Organic Chemistry, 2008, 73(21): 8305-8316. DOI: 10. 1021/jo801436h.
- [11] Smith VK, Ndou TT, Warner IM. Spectroscopic study of the interaction of catechin with α -, β -, and γ -Cyclodextrins[J]. Journal of Physical Chemistry, 1994, 98(35): 8627-8631. DOI: 10. 1021/j100086a007.
- [12] Otagiri M, Uekama K, Ikeda K. Inclusion complexes of β -cyclodextrin with tranquilizing drugs phenothiazines in aqueous solution[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1975, 23: 188-195. DOI: 10. 1248/cpb. 23. 188.
- [13] Singh AP, Cabrer PR, Alvarez-Parrilla E, Mejjide F, et al. Complexation of 6-deoxy-6-(aminoethyl) amino- β -cyclodextrin with sodium cholate and sodium deoxycholate [J]. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 1999, 35: 335-348. DOI: 10. 1023/A: 100816752054.
- [14] Benesi HA, Hildebrand JH. A Spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons[J]. Journal of the American Chemical Society, 1949, 71: 2703-2707. DOI: 10. 1021/ja01176a030.
- [15] Dang XJ, Tong J, Li HL. The electrochemistry of the inclusion complex of anthraquinone with β -cyclodextrin studied by means of OSWV [J]. Journal of Inclusion

- Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry, 1996, 24: 275-286. DOI: 10. 1007/BF01041113.
- [16] 童林荟. 环糊精化学-基础与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 134, 163-176.
- [17] Hapiot F, Tilloy S, Monflier E. Cyclodextrins as supramolecular hosts for organometallic complexes[J]. Chemical Reviews, 2006, 106 (3): 767-781. DOI: 10. 1021/cr050576c.
- (收稿日期 2016-07-15)
-
- (上接第 356 页)
- [12] Lee N, Kim D K, Kim E S, et al. Comparative interactions of SIRT6 and SIRT7: Implication of functional links to aging[J]. Proteomics, 2014, 14 (13): 1610-1622. DOI: 10. 1002/pmic. 201400001.
- [13] Ryu D, Jo YS, Lo Sasso G, et al. A SIRT7-dependent acetylation switch of GABP β 1 controls mitochondrial function[J]. Cell Metab, 2014, 20 (5): 856-869. DOI: 10. 1016/j. cmet. 2014. 08. 001.
- [14] Ford E, Voit R, Liszt G, et al. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription[J]. Genes Dev, 2006, 20 (9): 1075-1080. DOI: 10. 1101/gad. 1399706.
- [15] Tsai YC, Greco TM, Cristea IM. Sirtuin 7 plays a role in ribosome biogenesis and protein synthesis[J]. Mol Cell Proteomics, 2014, 13 (1): 73-83. DOI: 10. 1074/mcp. M113. 031377.
- [16] Tsai YC, Greco TM, Boonmee A, et al. Functional proteomics establishes the interaction of SIRT7 with chromatin remodeling complexes and expands its role in regulation of RNA polymerase I transcription[J]. Mol Cell Proteomics, 2012, 11 (5): 60-76. DOI: 10. 1074/mcp. M111. 015156.
- [17] Hubbi ME, Hu H, Kshitiz, et al. Sirtuin-7 inhibits the activity of hypoxia-inducible factors[J]. J Biol Chem, 2013, 288 (29): 20768-20775. DOI: 10. 1074/jbc. M113. 476903.
- [18] Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8 (10): 774-785. DOI: 10. 1038/nrm2249.
- [19] Shin J, He M, Liu Y, et al. SIRT7 represses Myc activity to suppress ER stress and prevent fatty liver disease[J]. Cell Rep, 2013, 5 (3): 654-665. DOI: 10. 1016/j. celrep. 2013. 10. 007.
- [20] Sundaresan NR, Samant SA, Pillai VB, et al. SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28 (20): 6384-6401. DOI: 10. 1128/MCB. 00426-08.
- [21] Yoshizawa T, Karim MF, Sato Y, et al. SIRT7 controls hepatic lipid metabolism by regulating the ubiquitin-proteasome pathway[J]. Cell Metab, 2014, 19 (4): 712-721. DOI: 10. 1016/j. cmet. 2014. 03. 006.
- [22] Kang HS, Okamoto K, Kim YS, et al. Nuclear orphan receptor TAK1/TR4-deficient mice are protected against obesity-linked inflammation, hepatic steatosis, and insulin resistance[J]. Diabetes, 2011, 60 (1): 177-188. DOI: 10. 2337/db10-0628.
- [23] Picard F, Kurtev M, Chung N, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ [J]. Nature, 2004, 429 (6993): 771-776. DOI: 10. 1038/nature02583.
- [24] Bosch-Presegué L, Vaquero A. The dual role of sirtuins in cancer[J]. Genes Cancer, 2011, 2 (6): 648-662. DOI: 10. 1177/1947601911417862.
- [25] Yu H, Ye W, Wu J, et al. Overexpression of sirt7 exhibits oncogenic property and serves as a prognostic factor in colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20 (13): 3434-3445. DOI: 10. 1158/1078-0432. CCR-13-2952.
- [26] Lai CC, Lin PM, Lin SF, et al. Altered expression of SIRT gene family in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Tumour Biol, 2013, 34 (3): 1847-1854. DOI: 10. 1007/s13277-013-0726-y.
- (收稿日期 2015-10-03)