

毛细管电泳法研究环糊精与药物芦丁和氯霉素的相互作用

傅崇岗, 杨冬芝

(聊城大学化学化工学院, 山东 聊城 252059)

摘要 :采用毛细管电泳淌度移动法测定了 β -环糊精与芦丁和氯霉素这两种药物的包含常数及包含反应的热力学参数。所用未涂层熔融石英毛细管的规格为内径 $50 \mu\text{m}$, 总长 37 cm , 有效长度 30 cm , 电泳缓冲液为 25 mmol/L 硼砂 + 100 mmol/L 硼酸 (pH 8.6), 并加入不同浓度的 β -CD。在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 时测得芦丁和氯霉素与 β -CD 的包含常数分别为 98.5 和 1204 L/mol 。通过测定不同温度下的包含常数, 求得包含反应的系列热力学参数。结果表明 β -CD 与两种药物的包含反应焓熵互补现象明显。采用 MM2 力场对 β -CD 与两种药物分子的包含物的稳定构型进行了分子力学模拟, 模拟结果与实验结果相符。

关键词 :毛细管电泳; β -环糊精; 芦丁; 氯霉素; 包含常数; 热力学参数

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)06-0673-04

Investigation on Interactions of Rutin and Chloramphenicol with β -Cyclodextrin Using Capillary Electrophoresis

FU Chonggang, YANG Dongzhi

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract : The interactions of two medicines of rutin and chloramphenicol with β -cyclodextrin were investigated using mobility shift method by capillary electrophoresis. The size of the capillary column was $37 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$ i. d. with an effective length of 30 cm . The running buffer was a mixture of 25 mmol/L sodium borate and 100 mmol/L boric acid (pH 8.6). Effective mobilities of the two medicines changed with altering the concentration of β -cyclodextrin. By nonlinear least square fitting curve, the inclusion constants of 98.5 and 1204 L/mol for rutin and chloramphenicol were obtained at $25 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively. The inclusion constants at different temperatures were determined, from which a series of thermodynamic parameters were derived. Experimental results show that an obvious relationship of mutual compensation between enthalpy and entropy existed in these inclusion reactions. The most stable configurations of the inclusions were calculated using MM2 force field, and the results were well in agreement with the experimental results.

Key words : capillary electrophoresis; β -cyclodextrin; rutin; chloramphenicol; inclusion constants; thermodynamic parameters

环糊精(CD)具有中空圆筒状结构以及内疏水、外亲水的结构特性,它在水溶液中包含尺寸适宜的药物分子至其疏水环状空腔中,使药物的稳定性、挥发性、溶解性等理化性质发生显著变化。 β -环糊精因其价格便宜、可以选择性地包含许多分子,目前应用最为广泛。包含常数 K 是描述主客体之间特异性相互作用的最主要参数。因此通过测定药物分子与环糊精之间的包含常数,可以为 β -环糊精对客体分子的选择性提供一个理论依据。

包含常数的测定方法有很多,大多以包含物形成时所引起的某一物理或化学性质为依据,如电位法、极谱法、光度法、高效液相色谱法以及荧光法等^[1]。荧光法、极谱法简便易行,但只局限于有荧光或电活性的物质,其他方法则存在试剂用量大、主客体化合物纯度要求高等不同问题。近年来采用毛细管电泳法测定包含常数的报道日见增多,常采用的方法有淌度移动法^[2,3]、空亲和毛细管电色谱法^[4]、部分填充法^[5]、配体分离法^[6,7]和前沿分析

法^[8,9]等。淌度移动法是通过测定客体在含有不同浓度主体溶液中的电泳淌度(或迁移时间)的变化或通过将客体加入缓冲液,测定主体电泳淌度(或迁移时间)来计算包含常数的方法。这种方法对受体的纯度要求低,只要求待测受体与其他物种分开即可。芦丁、氯霉素(其结构见图1)分别作为心血管和抗生素药物,其特点是溶解性差、生物利用度低,而被环糊精包含后可有效解决上述问题,因此研究这两种药物与环糊精的包合作用具有重要意义。本文采用毛细管电泳淌度移动法,同时测定了 β -环糊精与芦丁、氯霉素这两种药物的包含常数。并研究了温度对包含常数的影响,得到了此包含反应的热力学参数。

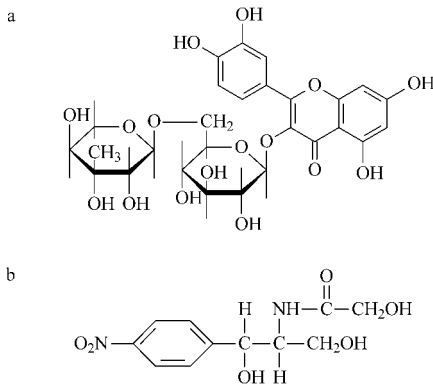


图 1 芦丁(a)和氯霉素(b)的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of rutin (a) and chloramphenicol (b)

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

P/ACE 5500 型毛细管电泳仪(美国 Beckman 公司),紫外在线检测, System Gold 软件控制仪器操作并采集数据(采集频率 5 Hz),未涂层熔融石英毛细管(河北永年光纤纤维厂)内径 50 μm ,总长 37 cm,有效长度 30 cm。 β -CD(华北地区特种化学试剂开发中心,化学纯),在二次蒸馏水中重结晶两次;氯霉素(北京天象鑫隆生物医学科技有限公司,分析纯);芦丁(ACROS 进口分装,北京化学试剂公司,分析纯);其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

电泳分离电压为 20 kV,入口为正极,紫外检测波长为 280 nm;电泳缓冲液为 25 mmol/L 硼砂 + 100 mmol/L 硼酸(pH 8.6),并加入不同浓度的 β -CD;样品储备液由水配制,然后由电泳缓冲液分别稀释至 2.06 mmol/L(氯霉素)和 0.088 mmol/L(芦丁),流体动力进样:3.45 kPa(0.5 psi) \times 5 s。进样前分别用 0.1 mol/L NaOH、蒸馏水以及缓冲

液各冲洗 1 min。每个样品连续运行 4 次,乙醇为电渗流标记物。将柱温分别控制在 20、25 和 30 $^{\circ}\text{C}$,按上述方法进行实验。

2 理论部分

将主体物质 β -环糊精加入到电泳缓冲液中,客体作为样品注入缓冲液,在电泳过程中主客体发生包合作用,形成包合物。在含一定量主体的缓冲液中,客体分子的电泳淌度 μ 取决于游离主体分子和包合物的摩尔分数,即改变缓冲液中主体物质的浓度[CD],客体分子的电泳淌度 μ 将发生变化,即电泳峰发生移动。由式(1)可知,以 μ 对主体物质的浓度[CD]进行非线性拟合,即可求出 K 值。

$$\mu = \frac{\mu_0 + \mu_{\infty} K[CD]}{1 + K[CD]} \quad (1)$$

其中 μ_0 为游离客体分子的电泳淌度, μ_{∞} 为包合物的电泳淌度。设主客体包含反应的焓变、熵变分别为 ΔH 和 ΔS ,那么根据 van 't Hoff 等温式和自由能公式,包含常数 K 与 ΔH 和 ΔS 的关系式为:

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (2)$$

求取不同温度(T)下包含反应的包含常数 K ,以 $\ln K$ 对 $1/T$ 作图,由直线的斜率和截距即可得到该反应的热力学参数 ΔH 和 ΔS 。

3 结果与讨论

3.1 几种影响因素的消除

在利用毛细管电泳法测定包含常数时,缓冲液的性质、配体分子浓度以及温度均对测定结果有影响^[10,11]。为避免缓冲液中可能引入与主体和客体发生作用的成分,缓冲液中没有加入其他添加剂。主体分子浓度的改变易导致溶液粘度变化,进而造成淌度的变化,因此在利用淌度移动法测定包含常数时必须消除粘度的影响。校正淌度可按式(3)进行计算^[12]

$$\mu' = \mu \frac{\eta}{\eta_0} = \mu \frac{I_0}{I} \quad (3)$$

其中 μ 、 μ' 分别为带电粒子校正前、后的电泳淌度, η 、 η_0 和 I 、 I_0 分别为有主体存在和无主体存在时溶液的粘度和电流值。

毛细管电泳分离过程中产生的焦耳热可引起管内温度升高,影响反应平衡,进而影响包含常数的测定,本实验采用液冷方法,使毛细管柱温度变化控制在 ± 0.1 $^{\circ}\text{C}$ 范围内。在所选择的最佳条件下,对每组实验重复进行 4 次,各种物质迁移时间的相对标准偏差均小于 5%。

3.2 两种药物在毛细管中的电泳行为

用毛细管区带电泳法测定包含常数要求客体分子、包合物及电渗流等三者的淌度有足够大的差别。实验选用 25 mmol/L 硼砂 + 100 mmol/L 硼酸作为缓冲液,乙醇作为电渗流标记物,氯霉素和芦丁分离较好(见图 2)。且在缓冲液中有、无 β -CD 存在时客体分子的电泳淌度有明显差别。

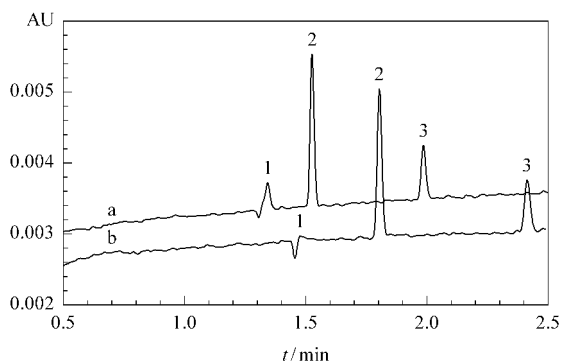


图 2 氯霉素和芦丁混合物的电泳分离图

Fig.2 Electropherograms of a mixture of chloramphenicol and rutin

β -CD concentrations : a. 8 mmol/L ; b. 0 mmol/L.

Peaks : 1. ethanol ; 2. chloramphenicol ; 3. rutin.

缓冲液中加入 β -CD 后,电渗流的峰形发生了变化(见图 2 中峰 1),这可能是由于乙醇进入 β -CD 的疏水内腔,使乙醇的吸光特性发生了改变。在该

实验条件下 β -CD 和乙醇均不带电荷,故对电渗流测定不会产生影响。

3.3 环糊精与两种药物的包含常数

改变缓冲液中主体环糊精的浓度,基于客体电泳淌度的变化以及毛细管的分离性能可以同时测定两种物质的包含常数。

表 1 为在 25 $^{\circ}$ C 下、缓冲液中 β -CD 浓度不同时两种药物在毛细管中的电泳淌度,该数值已根据粘度变化按式(3)进行了校正。

表 1 25 $^{\circ}$ C 下 β -CD 浓度不同时芦丁和氯霉素的电泳淌度
Table 1 Electrophoretic mobilities of rutin and chloramphenicol at different β -CD concentrations at 25 $^{\circ}$ C

[β -CD] / (mmol/L)	Mobility (10^{-8} m ² / (V · s))	
	rutin	chloramphenicol
0	2.537	1.381
2	2.481	1.090
4	2.441	1.040
6	2.411	1.019
8	2.387	1.008
10	2.368	1.001

对表 1 中的数值按式(1)进行非线性拟合,可得芦丁及氯霉素与 β -CD 的包含常数分别为 98.5 和 1204 L/mol(见表 2)。可以看出,本法对芦丁的测定值与文献[12]所报道的结果相近,氯霉素的测定值与文献[16]所报道的结果相近。

表 2 不同方法测得的包含常数

Table 2 Comparison of inclusion constants obtained by different methods

method	Rutin		Chloramphenicol		
	$K/(L/mol)$	reference	method	$K/(L/mol)$	reference
Phase dissolution	262	[13]	cyclic voltametry	960	[16]
Thin layer chromatography	562	[14]	spectrophotometry	3097	[17]
Fluorimetry	275, 234	[15]	this method	1204	
Chromatography	100	[12]			
This method	98.5				

3.4 环糊精与两种药物包含反应的热力学参数

按照上述方法求得不同温度 T 下包含反应的包含常数 K ,以 $\ln K$ 对相应的 $1/T$ 作图,按最小二

乘法拟合直线,由其斜率和截距得到包含反应的热力学参数 ΔH 、 ΔS ,自由能变 ΔG 也可以求出,结果见表 3。

表 3 β -环糊精与两种药物包含反应的热力学参数

Table 3 Thermodynamic functions of inclusion reactions between two medicines and β -CD

Medicine	$-\Delta H/$ (kJ/mol)	$-\Delta S/$ (J/(mol · K))	$-\Delta G/(kJ/mol)$			Regression coefficient
			293.15 K	298.15 K	303.15 K	
Rutin	38.16	89.61	11.92	11.38	11.02	0.9967
Chloramphenicol	63.62	154.4	18.49	17.58	16.88	0.9985

由表 3 中数据可见,在 β -CD 与两种药物的包含反应中,其熵因素和焓因素对 ΔG 所起的作用相反,其焓、熵互补现象明显,这种补偿关系的微观本质可以从分子间作用力和分子运动自由度两方面来解释。一方面,两种药物的苯环部分呈疏水性,易嵌

入环糊精内部疏水的空腔内,其包含反应为放热反应;另一方面,两种分子形成超分子包合物后,受分子间力的制约,主、客体分子运动自由度均减小,因此熵减小。而 ΔG 值的大小综合反映了熵变和焓变对主客体包含反应影响的总结果。

3.5 环糊精与两种药物的包合机理

β -CD 与小分子的包合过程主要受客体分子的亲水性及形状的影响,一般认为它们之间的包合作用主要有 3 种,即疏水作用、范德华力和氢键,主客体分子之间的范德华力是主要的,匹配越好,包合物越稳定。芦丁和氯霉素分子中非极性基团大小适于进入 β -CD 圆筒空腔中,所以包合反应容易进行,出现较负的自由能变化。其中氯霉素与 β -CD 的包合常数远大于芦丁与 β -CD 的包合常数,这可能与两者的结构有关。氯霉素中硝基苯基团进入 β -CD 空腔后,与苯环相连的 C 上的—OH 容易与 β -CD 空腔外侧的—OH 形成氢键,从而使包合物的稳定性加强。而芦丁分子上的邻苯二酚基团进入到 β -CD 空腔,但邻位—OC₁₂H₂₁O₉基团阻碍,降低了包合物的稳定性。图 3 为环糊精与芦丁和氯霉素形成包合物的稳定构型示意图。

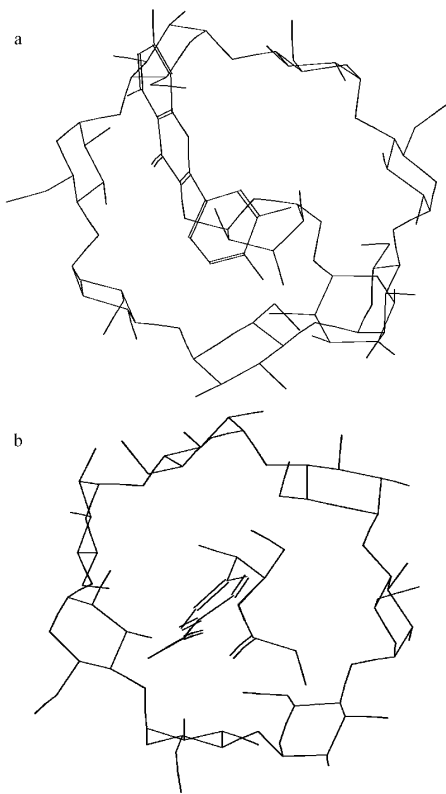


图 3 环糊精与芦丁(a)和氯霉素(b)所形成包合物的结构示意图

Fig.3 Structures of inclusion formed between β -cyclodextrin and rutin (a) or chloramphenicol (b)

利用 Cambridge Soft 公司推出的 Chem3D 软件,采用 MM2 力场,对 β -CD 与两种药物分子包合物的稳定构型进行了分子力学模拟,结果见表 4。由表 4 可知形成包合物后芦丁降低的能量小于氯霉素,即 $|\Delta E_{\text{芦丁}}| < |\Delta E_{\text{氯霉素}}|$,这意味着芦丁包合物不如氯霉素包合物稳定,其包合常数也应为 $K_{\text{芦丁}} < K_{\text{氯霉素}}$,这与前面的实验结果一致。

表 4 两种包合物的能量最小值及其包合前后的能量变化

Table 4 Minimum energies of two inclusion compounds and their energy changes during inclusion kJ/mol

Energy	β -CD-rutin	β -CD-chloramphenicol
E_{Stretch}	44.18	34.49
E_{Bend}	272.37	198.42
$E_{\text{Stretch-bend}}$	23.83	18.98
E_{Torsion}	152.61	114.41
$E_{\text{Non-1 A-VDW}}$	-542.94	-395.39
$E_{\text{1 A-VDW}}$	505.32	410.35
$E_{\text{Charge/Dipole}}$		-29.13
$E_{\text{Dipole/Dipole}}$	-86.65	-128.62
E_{Total}	368.72	223.51
ΔE	-190.48	-218.70

参考文献:

- [1] Zhao Yanfang, Fu Chonggang, Liu Ailin. Chinese Journal of Chromatography (赵艳芳,傅崇岗,刘爱林. 色谱), 2003, 21(3): 126
- [2] Nhujak T, Gooddall D M. Electrophoresis, 2001, 22(1): 117
- [3] Xia Zhining, Liu Yong, Zhang Xiaochuan, Qu Pengcheng. Chinese Journal of Chromatography (夏之宁,刘勇,张小川,屈鹏程. 色谱), 2001, 19(3): 219
- [4] Busch M H A, Boelens H F M, Kraak J C, Poppe H. J Chromatogr A, 1997, 775(1/2): 313
- [5] Heintz J, Hernandez M, Gomez F A. J Chromatogr A, 1999, 840(2): 261
- [6] Wang Qinggang, Wang Yiming, Luo Guoan, Yang Shubiao. Chinese Journal of Analytical Chemistry (王清刚,王义明,罗国安,杨树标. 分析化学) 2000, 28(6): 731
- [7] Zhou Dawei, Li Famei. Chinese Journal of Chromatography (周大伟,李发美. 色谱), 2003, 21(2): 143
- [8] Mohamed N A L, Kuroda Y, Shibukawa A, Nakagawa T, El Gizawy S, Askal H F, El Kommos M E. J Chromatogr A, 2000, 875(1/2): 447
- [9] Ding Yongsheng, Zhu Xiaofeng, Lin Bingcheng. Chinese Journal of Chromatography (丁永生,朱晓峰,林炳承. 色谱), 1999, 17(1): 58
- [10] Fang Mei, Zhao Rui, Han Huiwan, Yu Xiao, Sheng Li, Zang Bing, Liu Guoquan. Chinese Journal of Analytical Chemistry (方梅,赵睿,韩慧婉,余晓,盛力,藏冰,刘国诠. 分析化学), 2000, 28(8): 925
- [11] Ding Y S, Lin B C, Huie C W. Chromatographia, 2000, 52(5-6): 367
- [12] Penn S G, Bergstroem E T, Knights I, Liu G Y, Ruddick A, Goodall D M. J Phys Chem, 1995, 99(11): 3875
- [13] Shuang Shaomin, Guo Siyuan, Pan Jinghao, Li Lin, Cai Miaoyan. Chinese Journal of Analytical Chemistry (双少敏,郭祀远,潘景浩,李琳,蔡妙颜. 分析化学), 1998, 26(5): 564
- [14] Lederer M, Leipzig-Pagani E. Anal Chim Acta, 1996, 329(3): 311
- [15] Shuang S M, Pan J H, Guo S Y, Cai M Y, Liu C S. Anal Lett, 1997, 30(12): 2261
- [16] Li Peizhi, Mao Minyuan, Zhu Tingting. Chinese Journal of Analytical Chemistry (李培之,毛敏媛,朱婷婷. 分析化学), 1994, 22(1): 58
- [17] Wu Wenjuan, Zhang Xiaoling. Academic Journal of Guangdong College of Pharmacy (吴文娟,张小伶. 广东药学院学报), 1996, 12(4): 216