

竞争光度法研究两种抗癌嘌呤类药物与 β -环糊精衍生物的包合作用

卞伟 朱媛 杨芸芸 张爱萍 孙体健

(山西医科大学基础医学院 太原市新建南路 86 号 030001)

摘要 利用酚酞作为光谱探针, 竞争光度法研究了 β -环糊精衍生物在室温下, pH = 10.38 的缓冲液中与硫唑嘌呤和巯嘌呤的包合性能。固定 β -环糊精衍生物和酚酞的浓度, 随着硫唑嘌呤和巯嘌呤两种药物浓度增大, 酚酞的紫外吸收增加, 表明 β -环糊精衍生物与两种嘌呤类药物形成包合物并得出了包合常数。

关键词 硫唑嘌呤; 巯嘌呤; β -环糊精; 酚酞; 竞争包结

中图分类号: O 657.32 **文献标识码**: A **文章编号**: 1004-8138(2009)06-1650-04

1 前言

嘌呤类抗癌药物主要是次黄嘌呤和鸟嘌呤的衍生物, 现在已临床应用的嘌呤类抗癌药物主要有巯嘌呤(6-Mercaptopurine, 6-MP), 硫唑嘌呤(Azathioprine, BAN)等。尽管其疗效很好, 但在此类药物的使用过程中, 血液毒性、肝脏毒性、胰腺炎以及胃肠道紊乱等不良反应的发生率较高^[1,2], 因此大大限制了它们药效的发挥。另外, 由于它们很难溶于水, 而且在碱溶液中极不稳定, 所以很难制成针剂应用于临床。而 β -环糊精(β -CD)衍生物具有内疏水、外亲水的中空圆锥状结构特性, 它们作为药物载体能够除去药物的异味, 增加药物溶解度, 减少药物的挥发和氧化, 并提高其生物利用度和稳定性^[3-7]。所以研究抗癌嘌呤与环糊精的作用具有直接而现实的意义。但对于光学惰性或经环糊精包合未能引起光学信号显著改变的客体用直接吸光光度法和荧光法测定受到限制。采用竞争包合法是一种有效、合理的方法^[8,9]。

本文用竞争法研究了溶液体系中 β -环糊精衍生物与两种抗癌嘌呤的作用, 初步验证了溶液体系中, β -环糊精衍生物对 6-MP 和 BAN 的包合行为的可行性, 并对两种环糊精衍生物的包合行为进行了比较。对提高抗癌嘌呤类药物利用度、制成针剂及靶向药物的合成具有重要的理论指导意义。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

UV-760CRT(上海精密科学仪器有限公司); 酚酞(上海化学试剂分装厂); 羟丙基- β -CD、磺丁基- β -CD(山东新大精细化工有限公司, 平均取代度均为 6—7); 硫唑嘌呤、巯嘌呤(中国药品生物制品鉴定所); 其他试剂均为分析纯; 实验用水为二次蒸馏水。

2.2 实验方法

准确称取 0.0159g 酚酞用 95% 乙醇溶解, 并用二次蒸馏水定容到 100mL 容量瓶中, 浓度为

山西高校科技研究开发项目(200713006)和山西医科大学大学生创新项目(201231)资助

联系人, 手机: (0)13191009201; E-mail: bianwei2006@163.com

作者简介: 卞伟(1972—), 女, 江苏省南通市人, 副教授, 理学硕士, 主要从事分子发光研究工作。

收稿日期: 2009-03-23; 接受日期: 2009-04-07



$5.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。

分别准确移取 1.00mL 酚酞溶液于 10mL 的比色管中, 依次加入 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0mL 的 β -环糊精衍生物, 用 pH=10.38 的缓冲溶液稀释到刻度, 充分振荡后常温下放置 30min, 在紫外可见分光光度计上于 550nm 处测定吸光度。

固定酚酞与环糊精衍生物浓度分别为 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 和 $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 改变客体药物的浓度, 置于 10mL 比色管中用 pH=10.38 的缓冲溶液稀释至刻度, 充分振荡, 室温下放置 30min, 在紫外可见分光光度计上于 550nm 处测定 β -环糊精衍生物与药物包合物的吸光度。

3 结果与讨论

3.1 β -环糊精衍生物与酚酞包合反应

酚酞在碱性溶液中是以紫红色双负离子形式存在的, 与环糊精衍生物包结后, 其构型变为无色的内酯结构, 这一特性使其作为光谱探针研究环糊精衍生物与非生色基客体分子的包结成为可能。所以本实验选择 pH=10.38 的缓冲溶液作为实验条件。酚酞可以与环糊精衍生物在水溶液中形成 1:1 包合物, 即:



从酚酞与环糊精包合物的紫外-可见光谱图上, 可以看出酚酞在 550nm 处有最大吸收, 当 β -环糊精衍生物加入后, 酚酞在最大吸收波长 550nm 处的吸光度降低, 随着环糊精衍生物浓度增大, 吸光度有规律降低。环糊精衍生物与酚酞的包合常数 $K_{\text{CD-PP}}$ 可采用 Benesi-Hildebrand 方程求得:

$$1/(A - A_0) = 1/\{K_{\text{CD-PP}}[\text{PP}]_0[\text{CD}]_0\} + 1/\{k[\text{PP}]_0\} \quad (1)$$

式中: A , A_0 分别表示酚酞在有环糊精衍生物存在和无环糊精衍生物存在时的吸收光强度; $[\text{PP}]_0$ 和 $[\text{CD}]_0$ 分别表示酚酞和环糊精的总浓度; k 为仪器常数。

固定酚酞的浓度为 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 环糊精衍生物的浓度在 $0-2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 范围内改变, 随着环糊精衍生物的浓度增大, 最大波长吸光度减小, 且最大吸收波长有所红移, 直到酚酞与环糊精衍生物形成的包合物吸光度值不再变化, 包合反应趋于完成。

从原理公式(1), 以 $1/(A - A_0)$ 对 $1/[\text{CD}]_0$ 作图, 得一直线。截矩除以斜率即可求得包合常数。包合常数见表 1。

表 1 β -环糊精衍生物与酚酞包合常数

主体	客体	回归方程	相关系数	包合常数(L/mol)
HP- β -CD	酚酞	$y = -0.0002x - 1.6832$	$r = 0.9972$	8.416×10^3
SBE- β -CD	酚酞	$y = -0.0004x - 1.6832$	$r = 0.9998$	4.538×10^3

3.2 竞争包结法测定环糊精衍生物与药物包合常数

竞争分光光度法基于两种不同客体分子对同一环糊精衍生物空腔的竞争引起的吸光度显著变化来研究主体-客体包合物的包合性能。将客体疏唑嘌呤或疏嘌呤加到含环糊精衍生物-酚酞包合物的溶液中, 由于客体药物将部分酚酞从包合物中置换出来, 酚酞在 550nm 处的吸光度增大, 随着药物浓度增大, 酚酞吸光度值有规律增大。酚酞和客体药物两种客体分子对同一环糊精衍生物空腔竞争, 其竞争反应可表示为:



式中: CD-酚酞, CD-药物分别表示酚酞与 CD, 药物与 CD 形成的包合物。用 $K_{\text{CD-酚酞}}$ 表示 CD-酚酞包合物的包合常数, 得:

$$[\text{CD}] = 1/K_{\text{CD-酚酞}} \cdot (A - A_{\text{酚酞}}) / (A_{\text{CD-酚酞}} - A) \quad (3)$$

式中: $A_{\text{酚酞}}$ 表示游离的酚酞的吸光度, $A_{\text{CD-酚酞}}$ 是酚酞与 CD 包合后的吸光度, A 表示酚酞, 药物和 CD 共存时的溶液的吸光度。解方程(2)可得 $[\text{CD}]$, 将其代入方程(3)便可得 $K_{\text{CD-药物}}$, $K_{\text{CD-药物}}$ 表示 CD-药物包合物的包合常数。

$$K_{CD-药物} = \frac{[CD]_0 - [CD]}{[CD]} \{ [药物]_0 - [CD]_0 + [CD] \} \quad (4)$$

式中: $[CD]_0$ 和 $[药物]_0$ 分别表示环糊精衍生物和药物的总浓度; $[CD]$ 表示酚酞和药物共存时的游离的环糊精衍生物的浓度。这是方程的惟一的未知数, 它与溶液中酚酞的吸收度有关^[10]。

固定 β -CD, HP- β -CD, SBE- β -CD 和酚酞的浓度, 加入一系列不同浓度的客体分子硫唑嘌呤或硫唑嘌呤后, 扫描酚酞的吸收光谱, 部分图见图 1、图 2、图 3、图 4 所示。

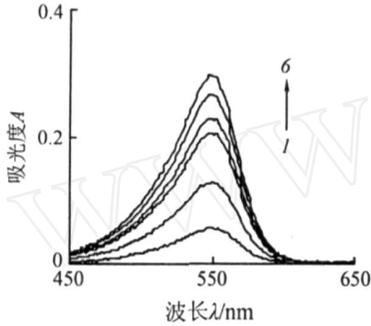


图 1 硫唑嘌呤对 HP- β -CD 紫外光谱的影响

- 1— $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L pp} + 5 \times 10^{-4} \text{ mol/L HP-}\beta\text{-CD}$;
 2—1+ $0.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤;
 3—1+ $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤;
 4—1+ $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤;
 5—1+ $2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤;
 6—1+ $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤。

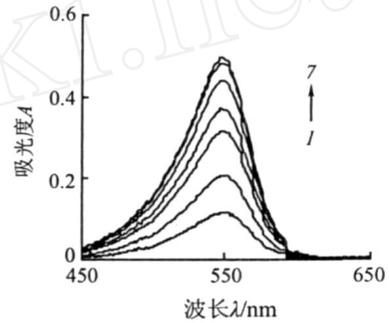


图 2 硫唑嘌呤对 SBE- β -CD 紫外光谱的影响

- 1— $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L pp} + 5 \times 10^{-4} \text{ mol/L SBE-}\beta\text{-CD}$;
 2—1+ $0.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤;
 3—1+ $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤;
 4—1+ $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤;
 5—1+ $2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤;
 6—1+ $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤;
 7—1+ $3 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤。

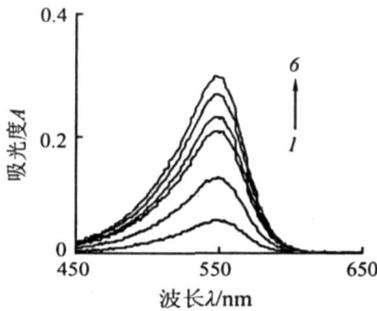


图 3 硫唑嘌呤对 HP- β -CD 紫外光谱的影响

- 1— $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L pp} + 5 \times 10^{-4} \text{ mol/L HP-}\beta\text{-CD}$;
 2—1+ $0.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤;
 3—1+ $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤;
 4—1+ $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤;
 5—1+ $2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤;
 6—1+ $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤。

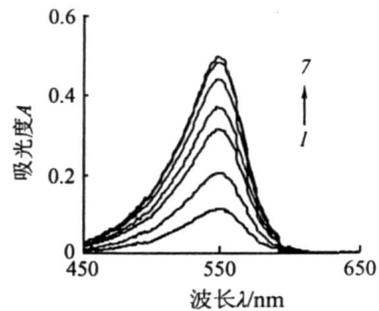


图 4 硫唑嘌呤对 SBE- β -CD 紫外光谱的影响

- 1— $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L pp} + 5 \times 10^{-4} \text{ mol/L SBE-}\beta\text{-CD}$;
 2—1+ $0.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤;
 3—1+ $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤;
 4—1+ $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤;
 5—1+ $2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤;
 6—1+ $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤;
 7—1+ $3 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 硫唑嘌呤。

由上述几个图可以看出随着硫唑嘌呤或硫唑嘌呤的浓度增大, 酚酞的吸收度增大, 且产生红移, 说明两种客体分子酚酞和硫唑嘌呤或硫唑嘌呤对同一环糊精衍生物空腔展开竞争, 竞争的结果一部分酚酞分子被药物分子顶出环糊精衍生物空腔。

根据公式 (3), (4), 将实验数据代入式中可计算出 β -环糊精衍生物与硫唑嘌呤或硫唑嘌呤的包

合常数, 见表 2。

表 2 环糊精与硫唑嘌呤和巯嘌呤的包含常数

主体	客体	包含常数(L/mol)
HP- β -CD	硫唑嘌呤	1.58×10^4
	巯嘌呤	2.18×10^4
SBE- β -CD	硫唑嘌呤	1.35×10^4
	巯嘌呤	1.64×10^4

3.3 讨论

环糊精衍生物的空腔具有一定的刚性, 所以环糊精衍生物在与客体分子包结配位时, 客体分子与环糊精衍生物疏水作用力, 氢键力, 范德华力, 空间匹配在其配位过程中均起主要作用。从实验可以看到, β -CD 衍生物与酚酞的包含具有良好的线性关系, 表明环糊精衍生物-酚酞包含物的包和比为 1:1, 其包含能力为: HP- β -CD > SBE- β -CD。由它们的紫外光谱可以看出, 硫唑嘌呤和巯嘌呤与环糊精衍生物形成包含物后, 酚酞在 550nm 处吸光度增强, 并且随着药物浓度的增大, 吸光度逐渐增强。结果可以看出, β -CD 衍生物对硫唑嘌呤和巯嘌呤的包含随主体的不同, 包含常数不同。

参考文献

- [1] 傅崇岗, 杨冬芝 毛细管电泳法研究环糊精与药物芦丁和氯霉素的作用[J]. 色谱, 2005, 23(6): 673—676
- [2] 刘秀萍, 杨郁, 张国梅等 竞争荧光包合法研究维生素B6与 β -环糊精及其衍生物的包和性能[J]. 分析化学, 2003, 31(8): 996—999
- [3] 宋晓虹, 刘晓红, 陈荣礼等 黄酮类化合物与 β -环糊精包含物的光谱学表征[J]. 分析测试学报, 2004, 23(1): 36—38
- [4] 卫艳丽, 董川 三种抗癌嘌呤类化合物与环糊精作用的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(7): 862—866
- [5] 陶利萍, 曹倩, 姚健敏 药物代谢遗传学检测在硫唑嘌呤治疗炎症性肠病中的应用[J]. 中华内科杂志, 2006, 45(6): 517—519
- [6] 卢琴, 赵成安, 刘春等 6-巯基嘌呤-H₂O₂-Cu²⁺-NaOH 体系荧光分光光度法测定 6-巯基嘌呤的研究[J]. 分析科学学报, 2007, 23(1): 33—36
- [7] 熊晖, 辛华雯, 吴笑春等 硫嘌呤类药物遗传药理学研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2007, 34(5): 356—360
- [8] 尤长城, 赵彦利, 刘育等 竞争包合法研究 β -环糊精及其两种衍生物对一些手性脂肪族客体分子的识别作用[J]. 分析化学, 2001, 22(2): 218—222
- [9] 刘秀萍, 杨郁, 张国梅等 竞争荧光包合法研究维生素B6与 β -环糊精及其衍生物的包含性能[J]. 分析化学, 2003, 22(2): 996—999
- [10] 董林芸, 申宝剑 超分子化学研究中物理方法[M]. 北京: 科学出版社, 2004 246—280

Study on the Inclusion Interaction of Two Anticancer Xanthines and β -Cyclodextrin's Derivatives by Competitive UV-V is Spectrophotometric Method

BIAN Wei ZHU Yuan YANG Yun-Yun ZHANG Ai-Ping SUN Ti-Jian
(The Medical University of Shanxi, Taiyuan 030001, P. R. China)

Abstract The competitive UV-V is spectrophotometric method was applied to study the inclusion interaction and determine the inclusion constant of β -CD derivatives with two anticancer xanthines with phenolphthalein as a spectral probe in aqueous buffer solution (pH=10.38) at room temperature, determine the inclusion constants of 6-MP, BAN and β -Cyclodextrin (β -CD)'s derivatives β -CD's derivatives can include two anticancer xanthines to form the inclusion compounds. The different inclusion stability constants of β -CD's derivatives encapsulating two anticancer xanthines were given.

Key words Azathioprine (BAN); 6-Mercaptopurine (6-MP); β -Cyclodextrin; Phenolphthalein; Competitive Inclusion