[Article]

www.whxb.pku.edu.cn

抗抑郁化合物 SIPI5358 与环糊精形成的非共价复合物

何小丹¹ 姜 丹¹ 陈 琛¹ 储艳秋¹ 丁传凡^{1,*}
翁志洁² 李建其^{2,*}

¹ 复旦大学化学系激光化学研究所, 上海市分子催化和功能材料重点实验室, 上海 200433;

² 上海医药工业研究院, 上海 200040)

摘要: 用电喷雾电离质谱(ESI-MS)和串联质谱(MS/MS), 并结合紫外光谱、荧光光谱等方法, 研究一种芳烷醇哌嗪类抗抑郁化合物 SIPI5358 与 α -、 β -、 γ -环糊精(CD)制备得到的非共价复合物. 质谱分析结果显示, SIPI5358 分子可以和 α -CD 生成配合比为 1:1 的非共价复合物, 而与 β -、 γ -CD 生成不同配合比的非共价复合物. 串联质谱的结果进一步验证 β -CD 与 SIPI5358 非共价复合物的组成. 用紫外光谱和荧光光谱实验对液相中非共价复合物的形成进行了辅助研究, 结果均再次验证了非共价复合物的生成. 荧光光谱实验测得 SIPI5358 与 β -CD 反应的生成常数 $K_f=3.45\times 10^3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

关键词: 环糊精; 抗抑郁; 非共价复合物; 紫外光谱; 电喷雾电离质谱; 荧光光谱

中图分类号: O641; O645

Non-Covalent Complexes of the Antidepressant Compound SIPI5358 with Cyclodextrins

HE Xiao-Dan¹ JIANG Dan¹ CHEN Chen¹ CHU Yan-Qiu¹ DING Chuan-Fan^{1,*}
WENG Zhi-Jie² LI Jian-Qi^{2,*}

¹Shanghai Key Laboratory of Molecular Catalysis and Innovative Materials, Institute of Laser Chemistry,
Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, P. R. China;

²Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, P. R. China)

Abstract: Non-covalent complexes of α -, β -, and γ -cyclodextrin (CD) with the antidepressant compound SIPI5358 were investigated by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), tandem mass spectrometry (MS/MS), UV spectroscopy, and fluorescence spectroscopy. The ESI-MS experimental results revealed that SIPI5358 reacted with the α -, β -, and γ -CD to form complexes with different coordination numbers. The tandem mass spectra further confirmed the formation of non-covalent complexes of SIPI5358 with β -CD. Binding of the complexes was also confirmed by UV as well as fluorescence spectra. The formation constant K_f was determined by fluorescence spectroscopy to be $3.45\times 10^3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for the complex of SIPI5358 and β -CD.

Key Words: Cyclodextrin; Antidepressant; Non-covalent complex; UV spectroscopy;
Electrospray ionization mass spectrometry; Fluorescence spectroscopy

抑郁症是一种常见的精神科的疾病, 易于复发, 需连续长时间服药, 目前已成为全球范围内精神科

自杀率最高的疾病之一. 普遍公认的治疗抑郁症药物包括单胺氧化酶抑制剂(MAOI)和三环类抗抑郁

Received: March 5, 2010; Revised: June 7, 2010; Published on Web: July 13, 2010.

*Corresponding authors. DING Chuan-Fan, Email: cfding@fudan.edu.cn; Tel: +86-21-65105204. LI Jian-Qi, Email: lijq@sipi.com.cn.

The project was supported by the National Natural Science Foundation of China (30772623) and National Project in Significant Creation of New Drugs During the Eleventh Five-Year Plan Period, China (2009ZX09103-047).

国家自然科学基金(30772623)及国家十一五项目重大新药创制(2009ZX09103-047)资助项目

© Editorial office of Acta Physico-Chimica Sinica

药(TCA)在内的第一代抗抑郁药,和以选择性五羟色胺(5-HT)再摄取抑制剂为主的第二类抗抑郁药^[1-2].单胺氧化酶抑制剂类药物曾一度广为应用,不久因引起高血压等严重副作用而被淘汰;而第二类抑郁药物大多具有阻断多种递质受体的效果,可能扰乱多种神经传导.因此,高效、低毒、副作用少的新药成为了研究的焦点. SIPI5358 是上海医药工业研究院的李建其课题组根据药物作用靶点,定向设计和合成的具有自主知识产权的新型抗抑郁活性化合物,属于芳烷醇哌嗪衍生物^[3],是针对 5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)及多巴胺(DA)再摄取过程定向设计合成的分子,已经在动物实验中达到了预期的三重选择性抑制作用,体现出显著的抗抑郁活性,其不良反应较常规抗抑郁药物少,起效更快,是一种很有开发前景的化合物.然而,由于 SIPI5358 水溶性较差,目前尚不能达到临床应用的要求,因此需要寻找新的方法来增加 SIPI5358 的溶解度.

环糊精(cyclodextrin, 简称 CD)^[4]是由环糊精糖基转移酶作用于淀粉或直链环糊精而形成的一类环状低聚糖,它是一种水溶性、非还原性、不易被酸水解、无毒、可食用、具有多孔性的白色晶体.常见的环糊精有 α -CD、 β -CD 以及 γ -CD 3 种,它们分别由 6–8 个葡萄糖单元以 1,4-糖苷键结合而成的^[5].由于连接葡萄糖单元的糖苷键不能自由旋转,环糊精分子不是直筒状的圆柱体结构,而是呈现两端直径不同的圆筒形结构,其中环糊精的伯羟基围成了圆筒形的小口,而其仲羟基围成了圆筒形的大口.具有这种特殊结构的环糊精分子外缘亲水而内腔疏水,可以作为主体分子(host)包络各种适当的客体分子(guest),如有机分子等,通过疏水作用、氢键和范德华力等与嵌入疏水孔洞的客体分子组合成单分子非共价复合物^[6-8].前人已经成功地用环糊精和药物结合形成非共价复合物的方法包合了抗肿瘤和抗高血压等药物^[9-10]来提高药效.因此,可以尝试采用制备环糊精和 SIPI5358 非共价复合物来提高其溶解度.

近年来,非共价复合物在医药上得到了广泛的应用,实验表明,一些小分子与生物大分子均能生成非共价复合物^[11-13],许多分析技术包括紫外-可见分光光度法、荧光光谱、核磁共振光谱^[14]等都被用于检测非共价复合物.质谱技术凭借其高灵敏度、高精度和高速度的优势^[15-18],有效地推动了非共价复合物的研究^[19-23].例如 Terrier 等^[24]在对该复合物进行碰撞诱导解离(CID)时,发现非共价复合物的电荷态和

多聚碱性氨基酸的性质不同会导致不同的解离途径.最近, Liu 等^[25]用电喷雾质谱研究了 22 个黄酮类化合物(其中 9 个黄酮苷元,13 个黄酮糖苷)与 DNA 三链形成非共价复合物,结果显示苷元的羟基位置、多糖的数量和黄酮类苷元的骨架在与 DNA 三链结合中起至关重要的作用,而糖苷展示比其相应的苷元对 DNA 三链有更高的键合能力.

SIPI5358, SIPI5357^[26]和 SIPI5838^[27]分子结构的特点是都具有哌嗪母体,两端分别为苯基和萘基的系列衍生物,它们都具有抗抑郁活性,其中 SIPI5838 已进入临床前研究阶段^[1].本实验室已经采用电喷雾质谱结合紫外光谱成功地研究了 SIPI5357^[26]和 SIPI5838^[27]与 α - β -CD 形成的非共价复合物,质谱测量结果表明, SIPI5357、SIPI5838 分子均可以与环糊精分子生成配合比(1:1)的非共价复合物.这些非共价复合物的形成可以显著地提高该抗抑郁化合物在水溶液中的溶解度.动物实验表明药物水溶解度的提高可以有效地减小该抗抑郁化合物在体内的沉积,使得它们具有临床使用的可能.另外,紫外分光光度法的辅助研究表明非共价复合物可以在液相中生成.溶解度实验计算了 SIPI5357、SIPI5838 和两种环糊精分子在液相中的生成常数,表明非共价复合物的稳定程度为 β -CD-SIPI5838 > α -CD-SIPI5838, β -CD-SIPI5357 > α -CD-SIPI5357.

前人研究结果^[28]显示当客体分子为块状或长链化合物时,可能会形成一分子 CD 与两分子客体或一分子客体与两分子 CD 相结合的复合物,例如双氯芬酸钠(diclofenac sodium, 简称 DS)和 β -CD 形成的复合物中,不仅含有配合比 1:1 的 β -CD-DS 产物,还含有配合比 1:2 或 2:1 的 β -CD-DS 产物. SIPI5838 分子的两端分别为苯基和萘基,与 CD 分子相比,具有长链化合物的特点,具有形成 2:1 的 β -CD-SIPI5838 复合物的潜在可能性.然而,哌嗪类 SIPI 系列抗抑郁化合物形成的复合物可能有哪几种配合比到目前为止还没有完全明白,这引起了我们的研究兴趣.此外,以前的工作主要是针对哌嗪类抗抑郁化合物和 α - β -CD 非共价复合物的研究,但尚未涉及 γ -CD 的研究,而且抗抑郁化合物 SIPI5358 和 β - γ -CD 非共价复合物的稳定性尚不明确.

本文在前面工作^[27]的基础上,将采用电喷雾质谱等技术研究 SIPI5358 和 α - β - γ -CD 之间的非共价相互作用,确定有几种不同配合比的复合物,用荧光和紫外光谱法证明药物和环糊精在液相中的反

图1 抗抑郁化合物 SIPI5358 的结构

Fig.1 Structure of antidepressant compound SIPI5358

应,并用荧光光谱法测定 β -CD 和 SIPI5358 反应的生成常数.

1 实验部分

1.1 化学试剂

实验中所用的 α -CD(纯度 98%), β -CD(纯度 98%), γ -CD(纯度 99%)购于 Sigma 化学试剂公司(St. Louis, MO, USA), 分子量分别为: α -CD, 972.86; β -CD, 1134.98; γ -CD, 1297.15. 甲醇(纯度 99.5%). 抗抑郁化合物 SIPI5358 由上海医药工业研究院提供(纯度 99%), 相对分子质量 467.1(不包含 $2\text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 其结构式如图 1 所示.

1.2 非共价复合物的制备

将 SIPI5358 溶于甲醇中, 配成 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液 a, 将 α -、 β -、 γ -CD 分别溶于去离子水中, 配成 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 依次为溶液 b、c、d. 取 1 mL 溶液 a 分别和不同体积的溶液 b、c、d 混合, 均配成 5:1、2:1、1:1、1:2、1:5 摩尔比的混合溶液, 所有混合样品用 50%(体积比)的甲醇稀释至 10 mL 后摇匀, 得到三套不同摩尔比的反应液, 放入 30 °C 的恒温箱内反应 24 h. 取上述 SIPI5358 分别与 α -、 β -、 γ -CD 混合的三种反应液(1:5)各 1 mL 进行混合, 并用 50%(体积比)的甲醇稀释至 10 mL 可得到混合溶液 A. 分别取 5 mL 溶液 b、c、d 和 3 mL 溶液 a 进行混合, 用 50%(体积比)的甲醇稀释至 30 mL 即溶液 B, 将溶液 B 在 30 °C 恒温箱内反应 24 h, 即可得到 SIPI5358 同时与 α -、 β -、 γ -CD 反应的混合溶液 B.

溶液 a、b、c、d 均用 50%(体积比)的甲醇稀释至 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 作为参比液. 所制备的溶液用于电喷雾电离质谱、串联质谱、紫外光谱、荧光光谱的测定.

1.3 电喷雾电离质谱的测定

质谱测定所用的仪器装置为电喷雾电离-三重四极杆质谱仪(API III Plus, PE-Sciex, 加拿大, m/z 2400). 质谱仪的质量标定选用聚丙二醇(PPG)标准样品. 所用的助喷雾气和帘气均为高纯氮气

(99.999%). 以 $1.2 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的进样速度进行电喷雾电离产生样品离子.

1.4 串联质谱分析

为了探讨 SIPI5358 溶液和环糊精所生成的非共价复合物结构, 我们还对质谱测量中所得到的非共价复合物离子进行了串联质谱分析, 测量了此非共价复合物离子的碰撞诱导解离产物, 所用的碰撞气体为高纯氩气. 碰撞能量数值由四级杆 Q_0 和碰撞池 Q_2 的电压差 $[n(R_0 - R_2)]$ 计算而得, 其中 n 为母离子电荷数, R_0 和 R_2 分别为离子导引四极杆 Q_0 和碰撞池 Q_2 上的直流电压.

1.5 紫外光谱的测定

紫外-可见分光光度计(Agilent8453, Agilent 公司, 美国). 紫外光谱在室温下测得, 样品的光谱扫描范围 190–260 nm.

1.6 荧光光谱的测定

1.6.1 药物 SIPI5358 与 β -CD 的荧光光谱测定

荧光分光光度计(Cary Eclipse, Varian 公司, 美国). 荧光光谱波长范围: 激发态 200–900 nm. 将荧光分光光度计设置为激发光栅和发射光栅都是 5 nm, 电压 600 V, 激发波长为 280 nm, 扫描速率 $600 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$. 然后各取 1.5 mL 溶液 a 和溶液 c 放入石英比色皿中, 立即放入荧光光度计中从开始扫描荧光发射谱图. 从 300 nm 扫到 500 nm, 起初每间隔 1 min 扫描一次, 直到荧光强度变化不大时开始扩大间隔.

1.6.2 用荧光光度计测定 SIPI5358 与 β -CD 的生成常数

每次取 1 mL 溶液 a, 依次与 1、2、3、4、5、6、7、8 mL 溶液 c 分别混合, 共 8 组溶液, 用 50%(体积比)的甲醇溶液稀释到 10 mL, 重复 3 次. 将上述混合液在 30 °C 恒温箱中放置 24 h. 荧光光度计扫描设定及扫描范围同上.

2 结果与讨论

2.1 α -、 β -、 γ -CD 和 SIPI5358 的质谱测量结果

图2 α -CD 和 SIPI5358 混合物的电喷雾电离质谱图

Fig.2 ESI-MS of mixture of α -CD with SIPI5358

Inset presents zoom scan of $[\alpha\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}]^+$ ion.

α -、 β -、 γ -CD 和 SIPI5358 在电喷雾电离质谱图中均以带一分子水的单电荷离子存在, 即 $[\alpha\text{-CD}+\text{H}_3\text{O}]^+$ 、 $[\beta\text{-CD}+\text{H}_3\text{O}]^+$ 、 $[\gamma\text{-CD}+\text{H}_3\text{O}]^+$ 和 $[\text{SIPI5358}+\text{H}]^+$. 它们的质谱峰 m/z 分别出现在 991.0、1153.1、1315.2 和 467.8 处.

2.2 α -、 β -、 γ -CD 和 SIPI5358 的非共价复合物质谱测量结果

α -CD 与 SIPI5358 以 5:1 混合反应后得到的质谱图如图 2 所示, $m/z=1440.5$ 所对应的分子离子为 $[\alpha\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}]^+$ 离子, 它表明, α -CD 与 SIPI5358 之间有新的复合物生成. 前人^[28]曾经报道环糊精分子是含有较多羟基的低聚糖化合物, 故 SIPI5358 客体分子和环糊精主体分子之间的结合力主要可能为氢键和疏水力.

β -CD 和 SIPI5358 以 5:1 混合反应后得到的质谱图如图 3 所示, 形成的非共价复合物以及两者的配合比均能够从 ESI 质谱图上得出. 值得注意的是, β -CD 与 SIPI5358 混合反应后得到的质谱图(图 3a)中除了生成两者配合比为 1:1 的复合物之外, 还有配合比为 1:2、2:1 两种形式存在. 图 3a 中的三个离子的放大图分别列于图 3(b, c, d), 其中 $m/z=1035.5$ 所对应的质谱峰为 $[\beta\text{-CD}+2\text{SIPI5358}+2\text{H}]^{2+}$ 离子(见图 3b), $m/z=1377.8$ 所对应的质谱峰为 $[2\beta\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}_2\text{O}+2\text{H}]^{2+}$ 离子(见图 3c), $m/z=1602.6$ 所对应的质谱峰为 $[\beta\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}]^+$ 离子(见图 3d). 与文献[27]中结构类似的 SIPI5838 比较, 可以发现 SIPI5838 也可以与两分子 β -CD 反应, 并生成 $m/z=$

图3 β -CD 和 SIPI5358 混合物的电喷雾电离质谱图

Fig.3 ESI-MS of mixture of β -CD with SIPI5358

(a) mixture of β -CD with SIPI5358; (b) $[\beta\text{-CD}+2\text{SIPI5358}+2\text{H}]^{2+}$; (c) $[2\beta\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}_2\text{O}+2\text{H}]^{2+}$; (d) $[\beta\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}]^+$

1348.6 的 $[2\beta\text{-CD}+\text{SIPI5358}+2\text{H}]^{2+}$ 离子, SIPI5358 分子中哌嗪的邻位连的是丁基, 而 SIPI5358 分子中哌嗪的邻位连的是甲基, 烷基基团的空间位阻对哌嗪衍生物与 $\beta\text{-CD}$ 的结合也许会产生一定的影响, 对这个问题还需做更多的工作才能作明确的解释。

$\gamma\text{-CD}$ 与 SIPI5358 以 5:1 混合反应后得到的质谱图如图 4 所示. 图 4a 为 $\gamma\text{-CD}$ 与 SIPI5358 按 5:1 混合反应后得到的质谱图, 图 4a 中的三个离子的放大图分别列于图 4(b, c, d), 其中图 4a 中 $m/z=1116.1$ 所对应的质谱峰为 $[\gamma\text{-CD}+2\text{SIPI5358}+2\text{H}]^{2+}$ 离子(如图 4b), $m/z=1539.9$ 所对应的质谱峰为 $[2\gamma\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}_2\text{O}+2\text{H}]^{2+}$ 离子(如图 4c), $m/z=1764.2$ 所对应的质谱峰为 $[\gamma\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}]^+$ 离子(如图 4d). 上述结果表明, 同 $\beta\text{-CD}$ 与 SIPI5358 形成的非共价复合物的结果类似, $\gamma\text{-CD}$ 与 SIPI5358 之间形成的复合物也是以 1:2、1:1、2:1 三种形式存在。

综合比较图 2-4 中相同摩尔比反应物得到的 1:1 复合物的质谱峰强度, 可以看出 $\gamma\text{-CD}$ 与 SIPI5358 反应强于 $\alpha\text{-}$ 、 $\beta\text{-CD}$ 和 SIPI5358 反应, 即三种环糊精和药物结合的程度依次为 $\gamma\text{-CD}>\beta\text{-CD}>\alpha\text{-CD}$. 这一

结果可能与环糊精的分子的大小以及 SIPI5358 的结构有关. $\alpha\text{-}$ 、 $\beta\text{-}$ 、 $\gamma\text{-CD}$ 的空腔容积分别为 0.174、0.262 和 0.427 nm³, 也就是说空腔内径 $\gamma\text{-CD}>\beta\text{-CD}>\alpha\text{-CD}$. 在 CD 包合物中, 化合物被包在 CD 的空腔中, 通常将 CD 称为主体, 而把进入其空腔内的化合物称为客体. 作为主体的 CD 与客体分子形式包合物的一个基本要求是尺寸的匹配, 即对 SIPI5358 分子中的有机基团具有识别能力. 一般而言, 由于 $\alpha\text{-}$ 、 $\beta\text{-}$ 、 $\gamma\text{-CD}$ 的空腔尺寸依次增大, 可以稳定包结不同大小的分子, 如 $\alpha\text{-CD}$ 的空腔尺寸适合包结单环芳烃, $\beta\text{-CD}$ 空腔尺寸适合包结萘环, 而 $\gamma\text{-CD}$ 的空腔尺寸适合包结苝、蒽等. 由于 SIPI5358 分子中的两端含有一个苯基和一个带有一OCH₃和一Cl 的萘基, 因此 $\beta\text{-}$ 、 $\gamma\text{-CD}$ 容易与萘基结合, 而 $\alpha\text{-CD}$ 容易与苯基结合, 导致三种环糊精和 SIPI5358 结合后生成的 1:1 复合物稳定程度依次为 $\gamma\text{-CD}>\beta\text{-CD}>\alpha\text{-CD}$, 该结果也被溶解度实验所证实^[29], 在该文中根据 Higuchi-Connors 法测得的 SIPI5358 与 $\gamma\text{-CD}$ 、 $\beta\text{-CD}$ 或 $\alpha\text{-CD}$ 形成的复合物的结合常数分别为 175.2、29.2、15.4 mol·L⁻¹.

图 4 $\gamma\text{-CD}$ 和 SIPI5358 混合物的电喷雾电离质谱图

Fig.4 ESI-MS of mixture of $\gamma\text{-CD}$ with SIPI5358

(a) mixture of $\gamma\text{-CD}$ with SIPI5358; (b) $[\gamma\text{-CD}+2\text{SIPI5358}+2\text{H}]^{2+}$; (c) $[2\gamma\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}_2\text{O}+2\text{H}]^{2+}$; (d) $[\gamma\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}]^+$

2.3 α - β - γ -CD 和 SIPI5358 按各种比例混合后的质谱检测

为了确认 SIPI5358 与环糊精生成的为特异性结合的非共价复合物,而不是分子团簇离子,我们将 α - β - γ -CD 和 SIPI5358 按摩尔比为 5:1、2:1、1:1、1:2、1:5 的不同比例混合后进行质谱检测后发现,改变反应物的配比会影响质谱峰的相对强度,但不会改变质谱峰 m/z 的位置,可见反应物的初始反应比不影响最终产物的生成,只影响复合物的相对生成量.它说明了 SIPI5358 与环糊精生成的为特异性结合的非共价复合物,而不是非特异性结合的分子团簇离子,因为反应物的初始浓度比将会决定团簇离子的大小,从而改变质谱峰的位置.

2.4 混合液 A 和 B 质谱测量结果

为了比较 α - β - γ -CD 和药物 SIPI5358 同时反应时相互之间的竞争关系,我们配制两种不同的溶液.溶液 A 为 3 份 SIPI5358 先与 α - β - γ -CD 分别按摩尔比 1:5 反应,然后再将反应液混合在一起的混合溶液;而溶液 B 为 3 份 SIPI5358 同时与 α - β -

γ -CD 反应的混合溶液 B(摩尔比, $n_{\text{SIPI5358}}:n_{\text{CD}}=3:5$).溶液 A 和溶液 B 的质谱图分别如图 5a 和图 5b 所示.对比图 5a 和 5b,发现两张图中出现了三种环糊精和药物按 1:1、1:2、2:1 结合的主要产物.

令人感兴趣的是在 α -CD、 β -CD、 γ -CD 三种环糊精中任意两种不同 CD 均可以与一个 SIPI5358 分子相结合并生成相应的产物,它们分别为 $m/z=1297.0$ 所对应的 $[\alpha\text{-CD}+\beta\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}_2\text{O}+2\text{H}]^{2+}$ 分子离子、 $m/z=1377.8$ 所对应的 $[\alpha\text{-CD}+\gamma\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}_2\text{O}+2\text{H}]^{2+}$ 分子离子、 $m/z=1459.0$ 所对应的 $[\gamma\text{-CD}+\beta\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}_2\text{O}+2\text{H}]^{2+}$ 分子离子.值得一提的是在图 5 中 $m/z=1539.9$ 所对应的 $[2\gamma\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}_2\text{O}+2\text{H}]^{2+}$ 分子离子峰却未观察到,其主要原因可能是因为当一分子 γ -CD 与 SIPI5358 结合之后,较大的空洞内径使得另一 γ -CD 分子与 SIPI5358 分子中的苯基的键合作用不如 β -CD 或 α -CD 的强.

图 5a 和 5b 中两两对应的质谱峰的相对强度发生了明显的变化.在图 5b 中, α - β -CD 和药物结合的一价离子峰增强,即 $m/z=1440.5$ 所对应 $[\alpha\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}]^+$ 离子、 $m/z=1602.6$ 所对应的 $[\beta\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}]^+$ 离子信号增强;另外多种二价离子的信号也增强, $m/z=1035.5$ 所对应的 $[\beta\text{-CD}+2\text{SIPI5358}+2\text{H}]^{2+}$ 离子、 $m/z=1377.8$ 所对应的 $[2\beta\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}_2\text{O}+2\text{H}]^{2+}$ 离子以及 $m/z=1116.1$ 所对应的 $[\gamma\text{-CD}+2\text{SIPI5358}+2\text{H}]^{2+}$ 离子和 $m/z=1297.0$ 所对应的 $[\alpha\text{-CD}+\beta\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}_2\text{O}+2\text{H}]^{2+}$ 离子峰强度均增强,其余的峰强度无明显变化.说明 α - β - γ -CD 同时和 SIPI5358 反应,与三种环糊精分别和药物反应结果是不同的,表明环糊精之间存在明显的竞争关系.

2.5 串联质谱分析结果

为了进一步确认 β -CD 和 SIPI5358 之间非共价复合物分子的组成,我们选择了 β -CD+SIPI5358 混合溶液中的 $[2\beta\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}_2\text{O}+2\text{H}]^{2+}$ 和 $[\beta\text{-CD}-2\text{SIPI5358}+2\text{H}]^{2+}$ 产物离子进行了串联质谱分析,即选出 $m/z=1377.8$ 对应的 $[2\beta\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}_2\text{O}+2\text{H}]^{2+}$ 和 $m/z=1035.5$ 对应的 $[\beta\text{-CD}+2\text{SIPI5358}+2\text{H}]^{2+}$ 离子作为前驱体离子进行碰撞诱导解离(CID)过程和产物分析,结果如图 6 所示.

碰撞能量固定为 70 eV(>70 eV, SIPI5358 会解离),碰撞气体密度 $\text{CGT}=80\times 10^{13} \text{ molecules}\cdot\text{cm}^{-2}$.如图 6a 所示,来自于前体离子 $[\beta\text{-CD}+2\text{SIPI5358}+2\text{H}]^{2+}$ ($m/z=1035.5$)的断裂碎片离子 $m/z=1602.6$ 和 $m/z=467.8$ 分别可以归属于为 $[\beta\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}]^+$ 和

图 5 混合溶液 A (a)和 B (b)电喷雾电离质谱图

Fig.5 ESI-MS of mixture solutions A (a) and B (b)
solution A: the reactant mixture of excess SIPI5358 with equimolar α -CD, β -CD, γ -CD, respectively; solution B: an equimolar mixture of α -CD, β -CD, γ -CD with excess SIPI5358

图6 β -CD 和 SIPI5358 形成的复合物前体离子的 CID 质谱图Fig.6 Collision induced dissociation (CID) mass spectra of the complexes of β -CD with SIPI5358(a) $[\beta\text{-CD}+2\text{SIPI5358}+2\text{H}]^{2+}$; (b) $[2\beta\text{-CD}+\text{SIPI5358}+2\text{H}]^{2+}$

$[\text{SIPI5358}+\text{H}]^+$. 进一步增大碰撞气体 CGT 至 $100 \times 10^{13} \text{ molecules} \cdot \text{cm}^{-2}$, 前体离子 $[\beta\text{-CD}+2\text{SIPI5358}+2\text{H}]^{2+}$ 完全解离, $m/z=1035.5$ 的离子峰信号消失, 由此可见, $m/z=1035.5$ 对应的前体离子是 β -CD 和 SIPI5358 按配合比 1:2 结合的复合物. 碰撞能量固定 70 eV, $\text{CGT}=80 \times 10^{13} \text{ molecules} \cdot \text{cm}^{-2}$ 时, $[2\beta\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}_2\text{O}+2\text{H}]^{2+}$ 的 CID 实验的质谱图见图 6b). 图 6b 中可以发现源于 $m/z=1377.8$ 对应的前体离子 $[2\beta\text{-CD}+\text{SIPI5358}+\text{H}_2\text{O}+2\text{H}]^{2+}$ 的断裂碎片离子 $m/z=467.8$ 和 $m/z=1153.1$, 它们分别可以归属于 $[\text{SIPI5358}+\text{H}]^+$ 和 $[\beta\text{-CD}+\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ 离子, 没有出现 β -CD 和 SIPI5358 按配合比 1:1 结合的 $[\beta\text{-CD}-\text{SIPI5358}+\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ 离子. 根据串联质谱图 6 可以推断 β -CD 和 SIPI5358 反应以后可以生成复合物, β -CD 与 SIPI5358 在复合物中的配合比可以为 1:2 或 2:1.

需要强调的是长期以来用电喷雾质谱在气相中测得的非共价复合物质谱信号能否直接代表溶液中的产物还存在一定的争议^[30]. 在电喷雾过程中解离或生成分子团簇(cluster)离子可能会造成测得的结果与溶液中的实际情况产生差异, 在特定条件下电

喷雾过程中可能会发生非特异性结合^[31]. 一些重要的情况列举如下: (1) 某些非特异性结合的复合物离子比特异性结合的离子在动力学上要稳定; (2) 某些复合物离子从溶液转移到气相的过程中会发生离子相互作用强化而疏水作用弱化; (3) 在分析试剂浓度较高时, 会发生质谱信号相互抑制作用. 例如, Klassen 等^[32]经研究发现对一个给定浓度的糖和碳酸酐酶(carbonic anhydrase)而言, 单糖、二糖以及亲水的糖容易在纳升喷雾过程中与碳酸酐酶形成非特异性结合. 然而, 非特异性结合对碳酸酐酶的结构以及复合物的电荷态均不敏感, 而且结合的配体数也远大于复合物的电荷态. 因此, 下面结合传统的溶液分析技术如紫外光谱等确认非共价复合物的形成.

2.6 SIPI5358 分别与 α -, β -, γ -CD 形成的复合物的紫外光谱图

为了验证 SIPI5358 可以和 α -, β -, γ -CD 在溶液中形成非共价复合物, 而不是在气相中形成的分子团簇, 我们还测定了由 SIPI5358 和 α -, β -, 或 γ -CD 制备而成的复合物溶液的紫外光谱.

在实验中我们选用 190–260 nm 区间对 α -, β -,

图7 SIPI5358 与 α -, β -, γ -CD 及两者混合物的紫外光谱图Fig.7 UV spectra of α -, β -, γ -CD, SIPI5358 and mixtures of α -, β -, γ -CD with SIPI5358

Curve c represents the UV absorbance spectrum of the complex and curve d represents the addition of the absorbances for SIPI5358 and cyclodextrin.

图 8 SIPI5358 与 β -CD 混合物在不同反应时间的荧光光谱图
 Fig.8 Fluorescence spectra for the mixture of SIPI5358 and β -CD with different reaction time

γ -CD 和 SIPI5358 以及它们 1:1 混合后经反应得到的混合物溶液进行紫外光谱的检测, 结果见图 7.

在图 7A 中, 曲线 a, b 分别代表 α -CD 溶液和 SIPI5358 溶液所测得的紫外光谱, 曲线 d 则为两者进行简单理论叠加后应该出现的光谱, 曲线 c 为实际测得两者混合后的光谱图. 从图中可以看到, 如果药物 SIPI5358 和 α -CD 是简单叠加, 则应该在 192.0 nm 处都会出现较强的吸收, 而实际得到的混合物吸收峰则发生了一定的偏移, 即在 192.5 nm 处出现较强吸收, 除了峰位置发生偏移外, 峰形也有变化, 说明将 SIPI5358 和 α -CD 混合后, 再进行紫外光谱的检测, 得到的紫外光谱不是反应物简单的叠加, 而是有新物质生成. 类似地 β -CD 与 SIPI5358 反应在

图 9 药物 SIPI5358 和不同浓度 β -CD 混合物的荧光光谱图
 Fig.9 Fluorescence emission spectra of SIPI5358 and β -CD with different concentrations
 $c_{\text{SIPI5358}}=1\times10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $10^4c_{\beta\text{CD}}/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: (a) 0, (b) 1.0, (c) 2.0, (d) 3.0, (e) 4.0, (f) 5.0, (g) 6.0, (h) 7.0, (i) 8.0

表 1 SIPI5358 与 β -CD 结合的生成常数和拟合线性方程
 Table 1 Linear equations and K_f values of β -CD with SIPI5358

Compound	Linear fit equation	R^2	$10^{-3}K_f/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
SIPI5358	$y=0.0016+4.2\times10^{-7}x$	0.925	3.94
SIPI5358	$y=0.0015+6.6\times10^{-7}x$	0.916	3.39
SIPI5358	$y=0.0012+6.6\times10^{-7}x$	0.912	3.01
average			3.45
S.D.			0.38
R.S.D.			11.1%

$x=c_{\beta\text{CD}}$, $y=(F-F_0)^{-1}$; S.D.: standard deviation;
 R.S.D.: relative standard deviation

193.1 nm 处出现较强吸收(图 7B), γ -CD 与 SIPI5358 反应在 193.0 nm 处出现较强吸收(图 7C). γ -CD 或 β -CD 与 SIPI5358 反应后混合物吸收峰相对于简单叠加的偏移均约为 1.1 nm, 大于 α -CD 与 SIPI5358 反应后混合物吸收峰的偏移(0.5 nm). 紫外光谱的结果表明 CD 和 SIPI5358 在溶液中可以生成非共价复合物, 而 γ -CD 或 β -CD 与 SIPI5358 的结合强度要略大于 α -CD.

2.7 药物 SIPI5358 与 β -CD 混合后的荧光光谱测定结果

从质谱的结果来看, β -CD 和药物 SIPI5358 的反应情况较好, 于是用荧光光谱进一步验证 β -CD 和药物 SIPI5358 相互反应及测定反应的生成常数.

图 8 中, 对应 0 min 的曲线是未加 β -CD 的空白药物溶液, 浓度也是 $1\times10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 从图 8 可以看出, 随着反应时间的增加, 药物 SIPI5358 和 β -CD 混合以后, 混合溶液的荧光强度会有所增加, 说明在发射波长为 366 nm 时生成了一种荧光更强的物质, 证明两者发生了反应, 反应 10 min 以后荧光强度几乎无变化, 因此推测这一系列反应都属于快反应.

2.8 用荧光光度计测定 SIPI5358 与 β -CD 复合物的生成常数

图 9 为 SIPI5358 在 $1\times10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下与不同浓度 β -CD(反应的荧光图谱 blank 是未加环糊精的空白药物, 浓度单位均为 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). 通过下式计算出 β -CD 和 SIPI5358 反应的生成常数和拟合线性方程列于表 1.

$$\frac{1}{F-F_0}=\frac{1}{(F_{\infty}-F_0)K_f c_{\beta\text{CD}}}+\frac{1}{F_{\infty}-F_0}$$

其中 F_0 是空白溶液的荧光强度, F_{∞} 为所有 SIPI5358 完全反应时的溶液的荧光强度. 生成常数的平均值为 $K_f=3.45\times10^3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

3 结 论

应用电喷雾电离质谱(ESI-MS)、串联质谱(MS/MS)并结合紫外光谱、荧光光谱技术,研究了新型抗抑郁化合物 SIPI5358(客体分子)与 α -, β -, γ -CD(主体分子)所形成的非共价相互作用.实验结果表明,在溶液中,SIPI5358与 α -, β -, γ -CD可以生成较为稳定的非共价复合物.使用ESI-MS及MS/MS技术,能够确定三种环糊精与SIPI5358之间非共价复合物的生成,并且可以快速和准确地确定复合物中主客体分子之间的配合比.研究证实药物SIPI5358可以和 α -CD生成1:1结合的产物,与 β -, γ -CD则可以分别生成配合比为1:2、1:1、2:1的非共价复合物.将三种环糊精和药物一起反应时,可以看出三种环糊精和药物之间的反应存在明显的竞争关系.另外,紫外光谱和荧光光谱实验测得的结果和ESI-MS得到的结果较为吻合,均证明在溶液中有新的复合物生成.用荧光光谱测得的生成常数 K_f 为 $3.45 \times 10^3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.本文的实验结果为今后利用质谱等技术研究环糊精与其他药物分子的非共价复合物打下了基础,并为以后解决提高药物溶解度的问题提供了新的思路 and 理论依据.

References

- 1 Zheng, Y. Y.; Gao, K.; Weng, Z. J.; Li, J. Q. *Acta Pharmaceutica Sinica*, **2010**, *45*: 324 [郑永勇, 高凯, 翁志杰, 李建其. 药学报, **2010**, *45*: 324]
- 2 Li, J. Q.; Huang, L. Y.; Xia, Y. Y.; Weng, Z. J.; Zhang, C. N. *Chin. J. Med. Chem.*, **2006**, *16*: 6 [李建其, 黄丽瑛, 夏玉叶, 翁志杰, 张椿年. 中国药物化学杂志, **2006**, *16*: 6]
- 3 Li, J. Q.; Huang, L. Y.; Dong, W. X.; Weng, Z. J.; Jin, H.; Ni, X. L.; Zhang, S. J.; Huang, C. F.; Gu, F. H. *Chin. J. Med. Chem.*, **2006**, *16*: 270 [李建其, 黄丽瑛, 董文心, 翁志杰, 金 华, 倪湘莲, 张绍静, 黄朝峰, 顾丰华. 中国药物化学杂志, **2006**, *16*: 270]
- 4 Chu, Y. Q.; Dai, X. H.; Jiang, D.; Jiang, G. Y.; Fang, X.; Ding, C. F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2010**, *24*: 2255
- 5 Chen, Q. S. *Chemical Industry Times*, **2007**, *21*: 49 [陈秋实. 化工时刊, **2007**, *21*: 49]
- 6 Szejtli, J. *Chem. Rev.*, **1998**, *98*: 1743
- 7 Zhu, X. L.; Wang, H. B.; Chen, Q.; Yang, W. C.; Yang, G. F. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, *55*: 3535
- 8 Ren, S. F.; Wang, H. Y.; Guo, Y. L. *Acta Chim. Sin.*, **2004**, *62*: 1959 [任士芳, 王昊阳, 郭寅龙. 化学学报, **2004**, *62*: 1959]
- 9 Guo, M. Q.; Song, F. R.; Liu, Z. Q.; Liu, S. Y. *J. Mass Spectrom.*, **2004**, *39*: 594
- 10 Yu, Z.; Cui, M.; Yan, C. Y.; Song, F. R.; Liu, Z. Q.; Liu, S. Y. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2007**, *21*: 683
- 11 Wilson, J. J.; Brodbelt, J. S. *Anal. Chem.*, **2007**, *79*: 2067
- 12 Wunderlich, B. *Thermochim. Acta*, **2003**, *403*: 1
- 13 Dai, Z. Y.; Chu, Y. Q.; Wu, B.; Wu, L.; Ding, C. F. *Acta Pharmacol. Sin.*, **2008**, *29*: 759
- 14 Xiao, Y. Y.; Song, Y. M.; Chen, Z. P.; Ping, Q. N. *Int. J. Pharmaceut.*, **2006**, *307*: 77
- 15 Xie, Y.; Zhang, J.; Yin, S.; Loo, J. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*: 14432
- 16 Chen, M. L.; Cook, K. D. *Anal. Chem.*, **2007**, *79*: 2031
- 17 Chu, Y. Q.; Pan, T. T.; Dai, Z. Y.; Yu, Z. W.; Zheng, S. B.; Ding, C. F. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **2008**, *24*: 1981 [储艳秋, 潘婷婷, 戴兆云, 俞卓伟, 郑松柏, 丁传凡. 物理化学学报, **2008**, *24*: 1981]
- 18 Lu, H. J.; Guo, Y. L.; Yang, P. Y. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2004**, *15*: 1612
- 19 Lu, H. J.; Yu, C. T.; Guo, Y. L. *Acta Chim. Sin.*, **2002**, *60*: 882 [陆豪杰, 余翀天, 郭寅龙. 化学学报, **2002**, *60*: 882]
- 20 Yue, G. H.; Xu, C. F.; Bian, L. P.; Zhang, S. Y.; Zhao, J. W.; Yang, P. Y. *J. Anal. Sci.*, **2000**, *16*: 496 [岳贵花, 许崇峰, 卞利萍, 张素艳, 赵建伟, 杨芑原. 分析科学学报, **2000**, *16*: 496]
- 21 Sun, W. X.; Liu, Z. Q.; Liu, S. Y. *Chin. J. Anal. Chem.*, **1998**, *26*: 111 [孙维星, 刘志强, 刘淑莹. 分析化学, **1998**, *26*: 111]
- 22 Bligh, S. W. A.; Haley, T.; Lowe, P. N. *J. Mol. Recognit.*, **2003**, *16*: 139
- 23 Zhang, H. R.; Zhang, H. Q.; Wang, Y. T.; Li, D.; Ding, L. *Chem. J. Chin. Univ.*, **2006**, *27*: 2061 [张华蓉, 张寒琦, 王玉堂, 李 丹, 丁 兰. 高等学校化学学报, **2006**, *27*: 2061]
- 24 Terrier, P.; Tortajada, J.; Buchmann, W. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2007**, *18*: 346
- 25 Wan, C. H.; Cui, M.; Song, F. R.; Liu, Z. Q.; Liu, S. Y. *Inter. J. Mass Spectrom.*, **2009**, *283*: 48
- 26 Lü, N.; Zheng, Y. Y.; Li, J. Q.; Pan, T. T.; Chu, Y. Q.; Zhou, M. F.; Ding, C. F. *Chin. J. Anal. Chem.*, **2009**, *37*: 199 [吕 娜, 郑永勇, 李建其, 潘婷婷, 储艳秋, 周鸣飞, 丁传凡. 分析化学, **2009**, *37*: 199]
- 27 Pan, T. T.; Chu, Y. Q.; Zhou, M. F.; Ding, C. F.; Lü, N.; Weng, Z. J.; Li, J. Q. *Acta Chim. Sin.*, **2008**, *66*: 2462 [潘婷婷, 储艳秋, 周鸣飞, 丁传凡, 吕 娜, 翁志洁, 李建其. 化学学报, **2008**, *66*: 2462]
- 28 He, P.; Lu, H. J.; Guo, Y. L. *Anal. Lett.*, **2003**, *36*: 493
- 29 Dai, X. H.; Chu, Y. Q.; Jiang, D.; He, X. D.; Fang, X.; Ding, C. F. *Chin. J. Anal. Chem.*, accepted [戴新华, 储艳秋, 姜 丹, 何小丹, 方 向, 丁传凡. 分析化学, 已录用]
- 30 Schmidt, A. C.; Neustadt, M.; Otto, M. *J. Mass Spectrom.*, **2007**, *42*: 771
- 31 Clark, S. M.; Konermann, L. *Anal. Chem.*, **2004**, *76*: 7077
- 32 Wang, W.; Kitova, E. N.; Klassen, J. S. *Anal. Chem.*, **2005**, *77*: 3060