

荧光法研究槲皮素与 β -环糊精及其衍生物的包合作用*

王云龙 李伟 王慧云 丁林 孙姗姗

(济宁医学院药学院, 山东日照 276826)

摘要 **目的** 详细研究槲皮素与环糊精在溶液中的包合行为并探讨影响包合的因素。**方法** 采用荧光光谱法系统研究水溶液中槲皮素与 β -CD、HP- β -CD 和 DM- β -CD 的包合作用,并考察溶液酸度和环糊精种类等对包合过程的影响,探讨包合机理。**结果** 槲皮素与环糊精在溶液中存在包合作用,其与三种环糊精的包合比均是 1:1,包合强度依次是 HP- β -CD>DM- β -CD> β -CD。在中性或酸性(pH 6.5)条件下,环糊精最适宜包合槲皮素。**结论** 环糊精衍生物比母体环糊精具有更好的包合能力,且环糊精更适合包合槲皮素的中性型体。

关键词 槲皮素;环糊精;荧光光谱

中图分类号:R94 **文献标志码**:A **文章编号**:1000-9760(2011)02-001-04

Study on the complexation of quercetin with β -Cyclodextrin and its derivatives by fluorescence spectroscopy

WANG Yun-long, LI Wei, WANG Hui-yun, et al

(Pharmaceutid College, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To investigate the inclusion behavior between quercetin (QUE) and cyclodextrins, and to elucidate the factors which influence the inclusion complexes. **Methods** The inclusion complexes of QUE with CDs including β -CD, HP- β -CD and DM- β -CD have been investigated using the method of fluorescence systemically. The stoichiometric ratio and the inclusion constants (K) were estimated from spectrofluometric titrations. The effect of pH and kinds of CDs was also assessed as well as the inclusion mechanism. **Results** Inclusion complexes were formed in aqueous solution between QUE and CDs, and the stoichiometric ratio of the three complexes was found to be 1:1. The inclusion constants showed that HP- β -CD provided the maximum inclusion ability, followed by DM- β -CD and β -CD. And maximum inclusion ability of β -CDs was measured in the case of pH 6.5 in this system. **Conclusion** Cyclodextrin derivatives provided better complexation abilities compared to the parental β -CD, and β -CDs were more suitable for inclusion of the neutral form of QUE.

Key words: Quercetin; Cyclodextrin; Fluorescence spectroscopy

槲皮素具有抗氧化、抗自由基、抗癌防癌、抗菌和抗过敏等作用^[1],对由腺苷二磷酸、胶原或凝血酶引起的血小板聚集及血栓有抑制作用。但由于槲皮素几乎不溶于水、稳定性差等影响了其临床应用。近年来环糊精包合物的出现为提高溶解度开辟了新的领域,其中包括对药物、维生素及食品着色剂等的增溶。环糊精(CD),是环糊精葡萄糖基转移酶作用于淀粉的产物,环糊精分子呈锥柱或截顶圆锥状花环,外亲水内疏水,可以选择性包合有机疏水小分子。难溶性药物被环糊精(CD)包合

后,能增加药物的溶解度和调节释放速率,并且提高药物的生物利用度和稳定性^[2]。

在有关槲皮素的报道中,Pralthad 等^[3]采用冻干法制备了槲皮素与 β -CD 和 HP- β -CD 的固体包合物,用差示扫描量热法(DSC),傅里叶红外(FT-IR),X-射线粉末衍射法和扫描电镜等进行表征。Tommasini 等^[4]通过红非罗啉实验,单细胞凝胶电泳实验和脂质过氧化反应等三方面测试了槲皮素与 α -CD, β -CD 固体包合物的抗氧化性能。表明槲皮素被环糊精包合后其抗氧化能力得到提高;Carment 等^[5]发现槲皮素被环糊精包合后其不仅提高了生物活性而且增加了其对外界酶氧化的抵抗能

* 济宁医学院 2009 年科研立项项目

力。山东大学邵伟等^[6]证明槲皮素-HP- β -CD 包合物可以大幅提高实验大鼠对槲皮素的吸收速度。众多的文献中大多是对固体包合物的制备表征或药动学研究,部分文献涉及到溶液中环糊精对槲皮素的增溶研究,尚无文献在溶液中系统研究两者的包合作用。本文拟用荧光光谱法系统研究溶液中槲皮素与 β -环糊精,羟丙基- β -环糊精和二甲基- β -环糊精的包合行为,并详细探讨影响包合过程的因素,以期为临床实践提供理论指导和技术支持。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

日立 F-4500 型荧光分光光度计(日本日立公司);pHS-3C 型酸度计(上海雷磁分析仪器厂);TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器责任有限公司)。

β -CD(广东省郁南县环状糊精厂),经沸水重结晶提纯;羟丙基- β -CD(HP- β -CD D. S. = 9.0)实验室自制;2,6-二甲基- β -CD(DM- β -CD D. S. = 9.0,淄博千汇精细化工有限公司);槲皮素(中国药品生物制品检定所);其他试剂均为国产分析纯试剂。实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

准确移取 50 μ l (1.0×10^{-2} mol/L) 的槲皮素溶液于 10 ml 比色管中,分别加入适当体积浓度均为 0.01 mol/L 的 β -CD、HP- β -CD 和 DM- β -CD 溶液,溶液酸度由 0.5 mol/L H_3PO_4/NaH_2PO_4 、0.5 mol/L NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 、0.5 mol/L $Na_2HPO_4/NaOH$ 磷酸盐缓冲溶液控制,用二次蒸馏水稀释至刻度、摇匀,在室温下静置 30 min,然后置于荧光池中,扫描荧光光谱并测量荧光强度值。入射和出射狭缝宽度均为 10 nm。

2 结果与讨论

2.1 环糊精-槲皮素包合物的形成及荧光光谱特性

槲皮素在 pH 6.5 水溶液中本身可以发射荧光,激发波长 397 nm,发射波长 528 nm。分别加入环糊精(β -CD、HP- β -CD、DM- β -CD)水溶液时,槲皮素的荧光强度出现不同程度的增长,且荧光发射波长有了明显的红移,如图 1(a)所示,说明槲皮素与环糊精形成了包合物。三种包合物中以 HP- β -CD 对槲皮素荧光的增强最为明显,DM- β -CD 增强效果次之。在 pH 8.0 和 pH 9.5 的环糊精水溶

液中观察到类似的荧光增强和波长移动现象。相同浓度下 β -环糊精衍生物对槲皮素的包合效果更为明显,荧光图谱无论强度还是峰位移变化幅度都较大,说明环糊精被修饰后,腔体增大,深度增加,比之母体 β -环糊精具有更好的包结性能,为槲皮素提供了更好的疏水环境。

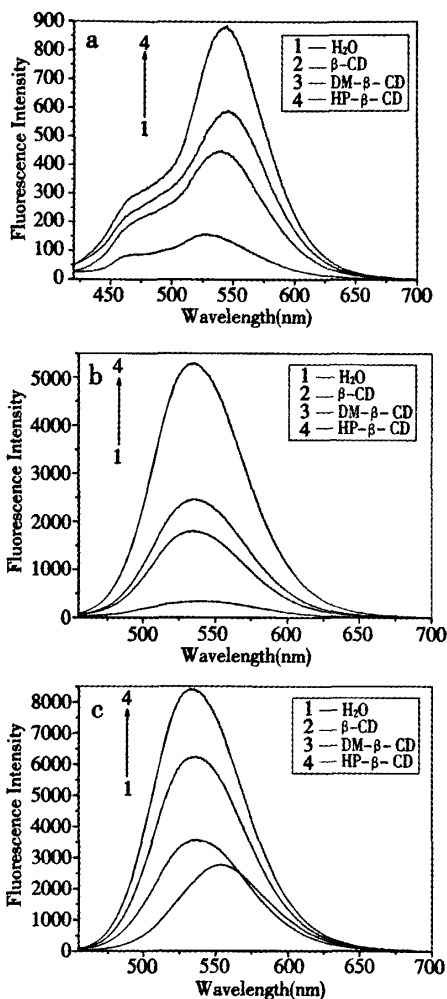


图 1 5.0×10^{-5} mol/L 槲皮素在环糊精溶液中的荧光光谱
a. pH=6.5, b. pH=8.0, c. pH=9.5

2.2 环糊精浓度的影响

如图 2 所示,槲皮素浓度保持在 5.0×10^{-5} mol/L,将环糊精浓度在 $0 \sim 8.0 \times 10^{-3}$ mol/L 范围内改变。结果表明,随着环糊精浓度的增加,荧光强度增加且逐渐趋于平缓,包合过程也趋于完成,其中以 HP- β -CD 最为显著。在 3 种环糊精中,形成包合物所需浓度最低的是 HP- β -CD,说明 HP- β -CD 对槲皮素的包合较有效。甲基环糊精次之,而母体环糊精包合能力较差。

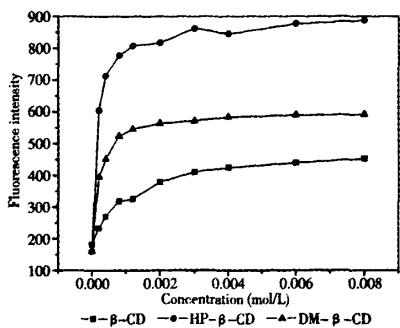


图 2 环糊精浓度对 5.0×10^{-5} mol/L 槲皮素荧光强度的影响 (pH=6.5)

2.3 槲皮素-环糊精包合比和包合常数的测定

若环糊精与槲皮素的包合摩尔比为 1:1, 则包合过程可写为: $CD + Q \rightleftharpoons CD-Q$

式中符号 CD、Q、CD-Q 分别代表环糊精、槲皮素及其包合物。包合常数可由如下双倒数方程求得^[7]。

截距除以斜率即得包合常数 K。

$$\frac{1}{(F-F_0)} = \frac{1}{\{K \cdot k \cdot Q \cdot [P]_0 \cdot [CD]_0\}} + \frac{1}{(k \cdot Q \cdot [P]_0)}$$

图 3 给出了在 pH 6.5 时环糊精-槲皮素体系的双倒数曲线, 曲线呈良好的线性, 证实了主-客包合物的化学计量比为 1:1。

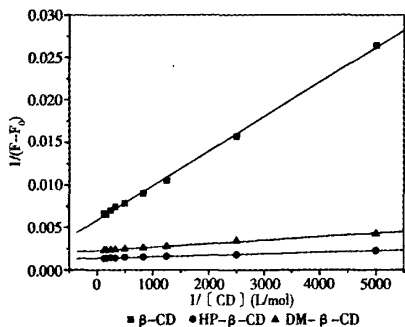


图 3 不同环糊精-槲皮素包合物的双倒数曲线 (pH=6.5)

由图 3 可以计算得到的包合常数。通常情况下, 对于主客体作用的体系, 采用 B-H 双倒数曲线法计算结合常数。但是该法要求客体的浓度必须远远大于主体浓度, 另外当主客体作用非常强时, 客体浓度的改变往往只能引起较小的光谱变化, 从而会引入较大的误差。而用非线性拟合计算结合常数, 既可以避免以上缺陷, 又不需要近似处理, 而且非线性拟合方法快捷、结果可靠。

对于结合比为 1:1 的平衡体系, 最小二乘法非线性拟合方程^[8]如下:

$$\Delta I = \frac{1}{2} \left\{ \alpha \left([H]_0 + [G]_0 + \frac{1}{K} \right) - \right.$$

$$\left. \sqrt{\alpha^2 \left([H]_0 + [G]_0 + \frac{1}{K} \right)^2 - 4\alpha^2 [H]_0 [G]_0} \right\}$$

公式中 $[H]_0$ 、 $[G]_0$ 分别代表主体环糊精和客体槲皮素各自的起始浓度, K 代表结合常数, ΔI 表示随着环糊精的加入, 槲皮素荧光强度的变化值, α 是在体系作用过程中所引起的被测定物构型变化的敏感因子。

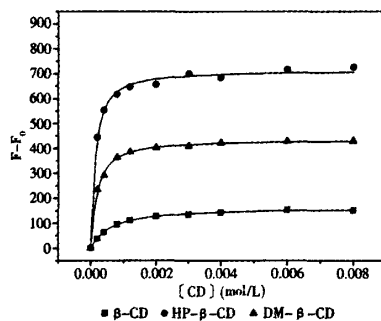


图 4 槲皮素与 β -CDs 包合物的非线性拟合曲线 (pH=6.5)

图 4 为环糊精与槲皮素的非线性拟合曲线, 良好的拟合结果证实该体系可以使用最小二乘法非线性拟合方程计算结合常数, 可以进一步证明二者结合比是 1:1, 与双倒数法得到的结果一致。槲皮素与三种环糊精的包合常数见表 1。

2.4 环糊精和溶液酸度对包合作用的影响

从表 1 可看出 HP- β -CD 和 DM- β -CD 的包合能力明显强于母体 β -CD, 其中 HP- β -CD > DM- β -CD > β -CD。因为 β -CD 衍生物较 β -CD 分子柔性增大, 腔口扩大, 疏水区域深度增加, 显示出优良的包合性能。并且, 从表 1 可以看出该体系包合常数对溶液 pH 值较敏感, 三种 β -CDs 与槲皮素包合常数的大小顺序均为: $K_{pH6.5} > K_{pH8.0} > K_{pH9.5}$ 。影响包合过程的一个重要因素是客体的疏水性, 这与溶液中槲皮素的分子型体存在形态有关。

表 1 QUE 与 CDs 在不同 pH 下的包合形成常数 K (mol/L)

CDs	pH=6.5	pH=8.0	pH=9.5
β -CD	1706	1033	924
HP- β -CD	10586	8035	7720
DM- β -CD	6112	3542	2514

槲皮素分子中有四个羟基 (-OH), 它在水溶液中随酸度的改变而解离, 呈现不同分子型体, 槲皮素分子在水溶液中的解离顺序是^[9]: 7-OH > 3'-OH > 5-OH > 4'-OH, 其^[10] $pK_{a1} = 6.74$, $pK_{a2} = 9.02$, $pK_{a3} = 11.55$ 。它在水中的平衡示意图见图 5。

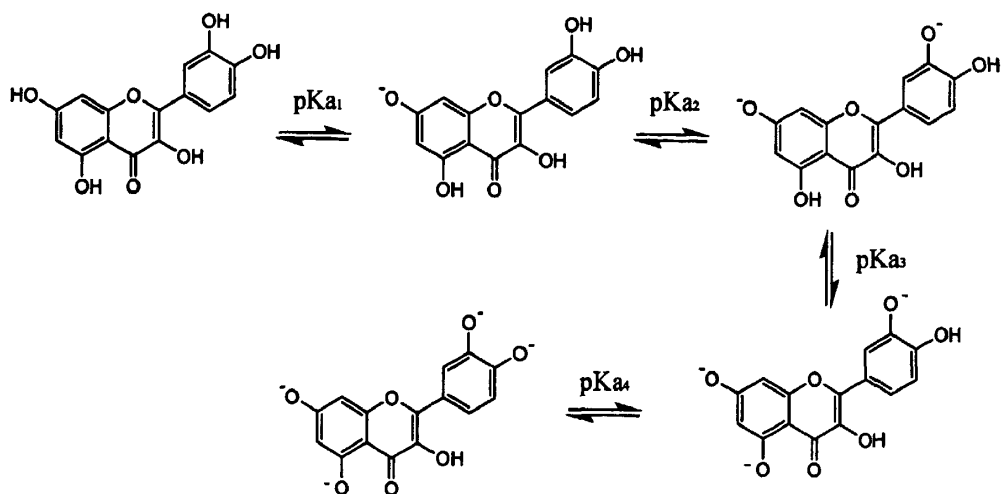


图5 槲皮素在水中的平衡结构式

2.5 作用机理

环糊精与客体分子形成包合物的驱动力主要来源于疏水作用力、范德华力、氢键、静电作用力、色散力等。环糊精在 $2 < \text{pH} < 11$ 是以中性分子型体存在,其主要的包合作用来自于客体分子与环糊精腔体的疏水作用。由图5可以看出在中性和酸性溶液中,槲皮素的中性分子型体居多。在碱性环境下,槲皮素的中性分子型体逐渐减少,离子型体增多。槲皮素中性分子型体在溶液 pH6.5 比 pH8.0 和 pH9.5 更具疏水性。因此三种环糊精 β -CD、HP- β -CD 和 DM- β -CD 更易包结其中性型体。并且实验结果表明修饰的环糊精比母体环糊精具有更好的包合槲皮素的性能。

参考文献:

- [1] 刘诗平,陈尚猛. 槲皮素及其衍生物的生物活性研究进展[J]. 中草药,1991,22(4):182-184.
- [2] Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers[J]. Adv Drug Deliv Rev,2007,59:645-666.
- [3] Pralhad T,Rajendrakumar K. Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC,FT-IR,X-ray diffraction and SEM analysis[J]. J Pharm Biomed Anal,2004,34:333-339.
- [4] Calabrò M L,Tommasini S. Effects of α - and β -cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones[J]. J Pharm Biomed Anal,2004,35:365-377.
- [5] Carmen LA, Isabel F, et al. Encapsulation of quercetin and myricetin in cyclodextrins at acidic pH[J]. J Agric Food Chem,2008,56:255-259.
- [6] 邵伟,许伟,李爱国,等. 槲皮素与羟丙基- β -环糊精包合物的药物动力学研究[J]. 中药材,2005,28(1):47-50.
- [7] Catena GC,Bright FV. Thermodynamic study on the effects of beta-cyclodextrin inclusion with anilino-naphthalene sulfonates[J]. Anal Chem,1989,61(8):905-909.
- [8] Liu Y,Han BH,Chen YT. Molecular Recognition and Complexation Thermodynamics of Dye Guest Molecules by Modified Cyclodextrins and Calixarene sulfonates[J]. J Phys Chem B,2002,106:4678-4687.
- [9] Mukai K,Oka W,Watanabe K, et al. Kinetic Study of Free-Radical-Scavenging Action of Flavonoids in Homogeneous and Aqueous Triton X-100 Micellar solutions[J]. J Phys Chem A,1997,101:3746-3753.
- [10] Jovanovic S V,Steenken S,Tosic M, et al. Flavonoids as Antioxidants[J]. J Am Chem Soc,1994,116:4846-4851.

(收稿日期 2011-01-05)