

橙皮苷/羟丙基- β -环糊精包合物的理化性质研究

刘本国¹, 张瑞婷¹, 吴晓楠¹, 李嘉琪¹, 袁尔东²

(1. 河南科技学院食品学院, 河南新乡 453003) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 橙皮苷具有抗氧化、抑菌、降血压、抗病毒、抗肿瘤及提高机体免疫力等多种生物活性功能, 在功能性食品, 医药和化妆品领域具有良好的应用前景, 但由于其在水中的溶解度过低, 限制了它的广泛应用。本研究采用溶剂法制备了橙皮苷/羟丙基- β -环糊精包合物, 以提高橙皮苷的水溶性, 采用紫外 (UV)、红外 (IR)、扫描电子显微镜 (SEM)、差示量热扫描 (DSC)、X-射线衍射 (XRD) 等波谱分析技术对该包合物的理化性质进行了研究。结果表明, 橙皮苷与羟丙基- β -环糊精包合后, 其物相发生了重大改变, 橙皮苷以无定形态完全分散在羟丙基- β -环糊精中, 二者以氢键或范德华力等非共价键形式相结合。通过与羟丙基- β -环糊精的包合, 橙皮苷在 30 °C 水中的溶解度也从 34.68 $\mu\text{g/mL}$ 增加至 2049.20 $\mu\text{g/mL}$, 其水溶性和稳定性得到了显著提高。

关键词: 橙皮苷; 羟丙基- β -环糊精; 包合物; 理化性质

文章编号: 1673-9078(2013)10-2349-2352

Physicochemical Properties of the Complex of Hesperidin and Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

LIU Ben-guo¹, ZHANG Rui-ting¹, WU Xiao-nan¹, LI Jia-qi¹, YUAN Er-dong²

(1. School of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

(2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Hesperidin possesses many bioactivities, such as antioxidant, antibacterial, lowering blood pressure, antiviral, antitumor and improving immunity, which can be used in functional food, medicine and cosmetics. But its poor solubility in water limited its wide applications. In this study, the complex of hesperidin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) was prepared to improve the water solubility of hesperidin by solvent method. Meanwhile, the physicochemical properties of the complex were investigated by ultraviolet-visible spectrometry (UV), infrared spectrometry (IR), scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffractometry (XRD). The results showed that the physical phase of hesperidin was significantly changed. It was completely dispersed in HP- β -CD matrix after inclusion. Hesperidin and HP- β -CD were combined with non-covalent bonds such as hydrogen bond and Van der Waals' force. HPLC analysis showed that the solubility of hesperidin in water at 30 °C was increased from 34.68 $\mu\text{g/mL}$ to 2049.50 $\mu\text{g/mL}$.

Key words: hesperidin; hydroxypropyl- β -cyclodextrin; complex; physicochemical property

橙皮苷又名橙皮甙、柑果苷, 是由一分子橙皮素与一分子的二糖缩水结合而成, 属于双氢黄酮类化合物, 存在于柑橘类和中草药 (如陈皮、枳实等), 是橙皮中最主要的类黄酮化合物^[1-3], 其具有维生素 P 样作用, 能保持微血管壁正常的渗透性, 对心血管疾病有显著疗效^[4-7]。近年来的研究表明, 橙皮苷具有降低人体内胆固醇、抗氧化、抑菌、降血压、抗病毒及提高机体免疫力等生物活性, 在功能性食品和医药领域具

收稿日期: 2013-07-03

基金项目: 国家自然科学基金 (31101232), 河南省高校科技创新团队支持计划 (13IRTSTHN006), 华南理工大学中央高校基本科研业务费项目 (2011ZM0104)

作者简介: 刘本国(1978-), 男, 博士, 副教授, 主要从事食品化学研究

通讯作者: 袁尔东(1975-), 女, 博士, 副教授, 主要从事食品化学研究

有良好的应用前景。但由于其在水中的溶解度过低, 限制了它的广泛应用。

利用 β -环糊精 (β -cyclodextrin, β -CD) 与活性化合物形成包合物的方法来增加活性化合物的水溶性和稳定性是多年来人们广泛研究的方法, 但 β -环糊精在水中的溶解度较低 (18.5 g/L、20 °C) 且有溶血作用, 限制了其对活性化合物的增溶效果及应用。羟丙基- β -环糊精 (Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, HP- β -CD) 是 β -环糊精的醚化衍生物, 其呈无定形, 极易溶于水 (>500 g/L、20 °C)。与 β -环糊精类似, HP- β -CD 分子内有一个疏水腔, 可对活性物质进行包埋, 对难溶性物质具有很好的增溶效果, 并可提高其稳定性, 促进活性物质在体内的释放, 增加吸收, 提高生物利用度。同时, HPCD 具有更高的安全性, 基本无溶血性和刺激性,

肾毒性低。美国食品药品监督管理局已经批准其在制药和食品中的应用^[8-10]。因此,由于其更高的水溶性和人体耐受性,HP- β -CD 正逐渐替代其母体 β -环糊精更多地应用于医药、保健食品和食品等各个领域。

本研究采用溶剂法制备橙皮苷/HP- β -CD 包合物,以提高橙皮苷的水溶性,并采用紫外(UV)、红外(IR)、扫描电子显微镜(SEM)、差示量热扫描(DSC)、X-射线衍射(XRD)对其理化性质进行研究,以期促进其在功能性食品及医药领域的广泛应用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

橙皮苷,阿拉丁试剂(上海)有限公司;羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD),上海西宝生物科技有限公司(平均分子量 1375);色谱纯甲醇,美国 DIKMA 公司。

1.1.2 仪器

1260 型高效液相色谱,美国 Agilent 公司;TU-1810PC 型紫外可见光光度计,北京普析通用仪器有限公司; TENSOR 27 型红外光谱仪,德国 Bruker 公司; Quanta 200 扫描电子显微镜,美国 FEI 公司; D8 型 X-射线衍射仪,德国 Bruker 公司; NETZSCH DSC 204F1 差示量热扫描仪,德国耐驰(netzsch)仪器制造有限公司; Alpha1-2LD 冷冻干燥机,德国 CHRIST 公司; Multifuge X1R 型台式高速冷冻离心机,美国 Thermo Scientific 公司。

1.2 方法

1.2.1 包合物的制备

称取 0.610 g 橙皮苷(1 mM)用 100 mL 无水乙醇溶解,加入 1.375 g HPCD(1 mM),室温下在磁力搅拌器上搅拌 6 h,过滤,得到透明溶液,然后 45 °C 下将其真空旋转蒸发干,加入 100 mL 蒸馏水充分溶解,得透明溶液,将其倒入培养皿中,冷冻干燥,得浅黄色固体,即为橙皮苷/羟丙基- β -环糊精包合物。

1.2.2 物理混合物的制备

称取橙皮苷 0.61 g、HP- β -CD 1.375 g 室温下在研钵中搅拌混匀,得橙皮苷与 HP- β -CD 的物理混合物。

1.2.3 紫外分析方法

分别称取橙皮苷、HP- β -CD、橙皮苷与 HP- β -CD 的物理混合物及包合物各 10 mg,用甲醇定容到 10 mL 的容量瓶中,适当稀释后,测定其在 220~400 nm 波长范围内的紫外吸收光谱。

1.2.4 红外分析方法

取适量的橙皮苷、HP- β -CD、橙皮苷与 HP- β -CD 的物理混合物及包合物,分别用溴化钾压片后,置于 TENSOR 27 型红外光谱仪中记录其红外光谱。

1.2.5 扫描电镜分析方法

取适量的橙皮苷、HP- β -CD、橙皮苷与 HP- β -CD 的物理混合物及包合物按扫描电子显微镜的要求制样,进行样品的外观扫描。

1.2.6 差示扫描量热分析方法

将 2.0 mg 左右的橙皮苷、HP- β -CD、橙皮苷与 HP- β -CD 的物理混合物及包合物分别均匀地铺在铝坩埚中放入差示量热扫描仪中,在氮气环境下进行扫描分析,扫描速率为 10 °C/min,扫描区间温度范围为 30 °C~300 °C。采用 DSC Proteus Analysis 软件对数据进行记录和处理。

1.2.7 X 衍射分析方法

取适量的橙皮苷、HP- β -CD、橙皮苷与 HP- β -CD 的物理混合物及包合物,进行 X 射线衍射,采用 CuK α 靶,石墨单色器衍射单色化,衍射角扫描范围为 5°~80°。

1.2.8 橙皮苷水溶性的测定

分别添加过量的橙皮苷及橙皮苷/HP- β -CD 包合物到 2 mL 30 °C 的水中,振荡 24 h 后,以 4000 r/min 的速度离心 15 min,取上清液,采用高效液相色谱仪测定橙皮苷含量。在进行高效液相色谱分析之前,所有样本均通过孔径为 0.45 μ m 的微滤膜。进样量为 10 μ L,检测波长为 285 nm。采用 Agilent 公司的 ZORBAX SB-C18 反相柱(4.6 \times 150 mm; 5 μ m)对样品进行分离,流动相为甲醇和水(6:4),流量为 1.0 mL/min。橙皮苷的定量采用外标法。色谱数据记录和处理采用 Agilent OpenLAB ChemStation 软件。

2 结果与讨论

2.1 紫外吸收光谱

紫外吸收光谱是物质吸收紫外光后,其价电子从低能级向高能级跃迁,产生吸收峰形成的。那些具有共轭双键(π 键)的化合物,其 π 电子易于被激发发生跃迁,而在紫外光区形成特征性的吸收峰。如图 1 所示,橙皮苷由于具有黄烷酮类的不饱和结构,使其在紫外区具有一个明显的吸收峰(285 nm);而 HP- β -CD 没有共轭双键结构,因此在紫外区没有吸收峰。橙皮苷与橙皮苷/HP- β -CD 包合物及它们的物理混合物在紫外图谱上没有差异,紫外特征吸收峰均出现在 285 nm 处,与橙皮苷相同。因此,橙皮苷与 HP- β -CD 在包合物形成的过程中没有形成新的不饱和键。

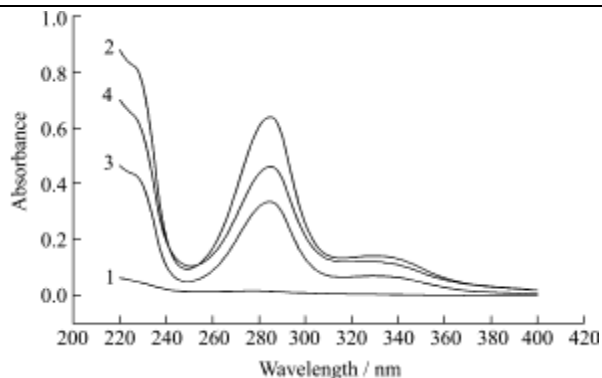


图1 HP-β-CD(1)、橙皮苷(2)、橙皮苷与HP-β-CD的物理混合物(3)及包合物(4)的紫外图谱

Fig.1 UV spectrum of hesperidin (1), HP-β-CD (2), their mixture (3) and complex (4)

2.2 红外光谱

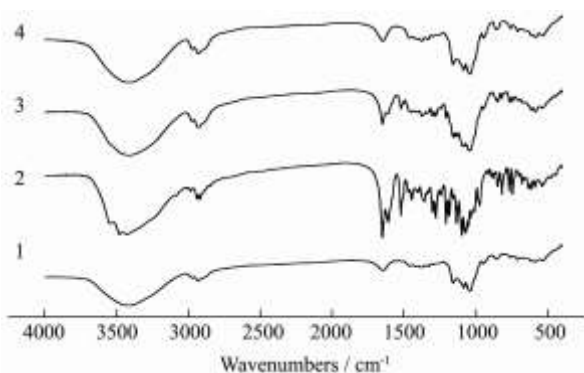


图2 HP-β-CD(1)、橙皮苷(2)、橙皮苷与HP-β-CD的物理混合物(3)及包合物(4)的红外图谱

Fig.2 IR spectrum of HP-β-CD (1), hesperidin (2), their mixture (3) and complex (4)

红外光谱是物质定性分析的重要方法之一，能够提供许多关于化合物官能团的信息。从图2可以发现，橙皮苷的红外图谱具有酚羟基（3478 cm⁻¹）、苯环（1445、1520、1470、1607 cm⁻¹）、羰基（1649 cm⁻¹）的特征吸收峰，HP-β-CD具有羟基（3417 cm⁻¹）、甲基（2971 cm⁻¹）、亚甲基（2930 cm⁻¹）和羰基（1653 cm⁻¹）的特征吸收峰。而橙皮苷和HP-β-CD的物理混合物与包合物的吸收光谱没有非常明显的差别，橙皮苷和HP-β-CD的特征吸收峰在混合物以及包合物的吸收光谱中都清晰可见，表现为橙皮苷和HP-β-CD的吸收光谱的叠加。但是在包合物中，橙皮苷在500 cm⁻¹到1500 cm⁻¹之间一些小的特征吸收峰几乎被HP-β-CD掩盖，同时包合物在扫描范围内没有出现新的吸收峰。这说明，橙皮苷与HP-β-CD在包合物的形成过程中，两者之间没有形成共价键，橙皮苷和HP-β-CD在包合物中仍然各自保留其基本的化学结构^[8]。

2.3 扫描电镜图

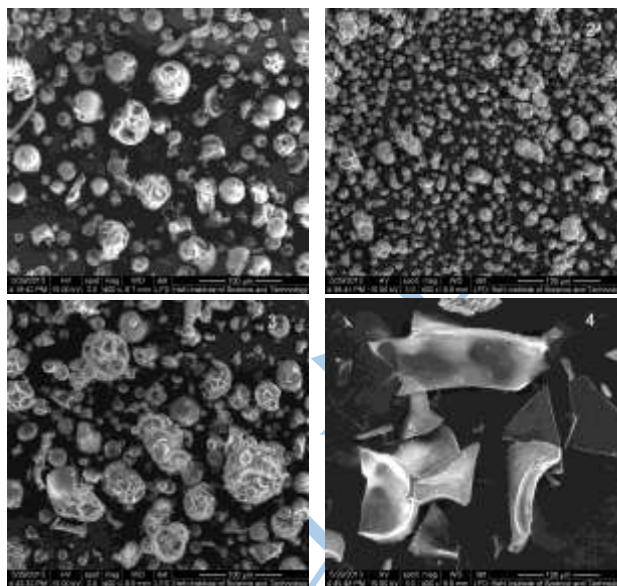


图3 HP-β-CD(1)、橙皮苷(2)、橙皮苷与HP-β-CD的物理混合物(3)及包合物(4)的扫描电镜图

Fig.3 Scanning electron micrographs of HP-β-CD (1), hesperidin (2), their mixture (3) and complex (4)

扫描电镜是一种利用电子束扫描样品表面从而获得样品信息的现代显微技术，它能产生样品表面的高分辨率图像，且为三维图像。图3为各样品的扫描电镜图，放大倍数均为400倍。从图中可以发现，橙皮苷颗粒呈实心的球状结构，而HP-β-CD的颗粒则呈多孔的球状结构，其尺寸明显大于橙皮苷。在二者的物理混合物中，两种形态的颗粒均能被观察到。而二者的包合物则呈明显的片状结构，其形态与橙皮苷和HP-β-CD相比发生了非常显著的变化。

2.4 差示扫描量热分析

差示扫描量热法(DSC)是在程序控制温度下，测量实验物质和参比物的功率差与温度关系的一种技术，通过研究物质的吸热、放热以及热容的改变量等热转变过程，提供定性和定量信息。如图4所示，橙皮苷在100℃到200℃之间具有两个强吸热峰，可能是橙皮苷分子在加热中脱去水分子造成的；在260℃处具有一个强吸热峰，是由于橙皮苷熔化所造成的。HP-β-CD仅在187℃有一个水分子的释放峰。橙皮苷和HP-β-CD的物理混合物的DSC图谱，主要表现为橙皮苷和HP-β-CD图谱的叠加。在包合物中，橙皮苷的吸热峰消失，主要表现出HP-β-CD的特征。这表明橙皮苷已完全分散在HP-β-CD中，并且它们之间存在着氢键或范德华力等作用力^[11]。

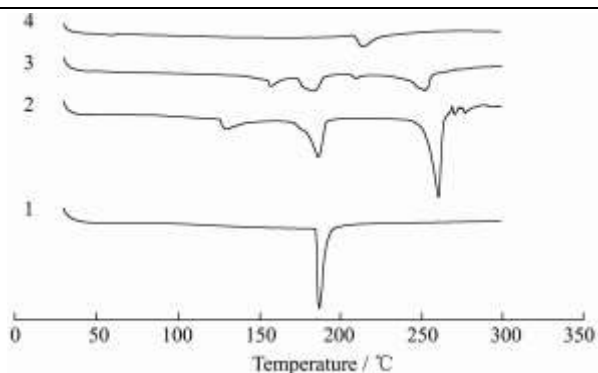


图4 HP-β-CD (1)、橙皮苷(2)、橙皮苷与HP-β-CD的物理混合物(3)及包合物(4)的差示扫描量热图

Fig.4 DSC curves of HP-β-CD (1), hesperidin (2), their mixture (3) and complex (4)

2.5 X-衍射分析

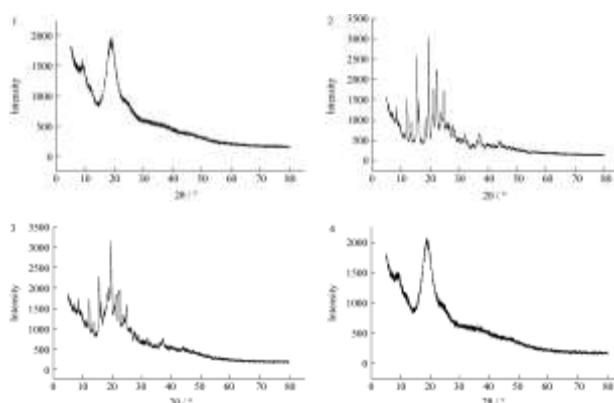


图5 HP-β-CD (1)、橙皮苷(2)、橙皮苷与HP-β-CD的物理混合物(3)及包合物(4)的X衍射图

Fig.5 XRD patterns of HP-β-CD (1), hesperidin (2), their mixture (3) and complex (4)

X衍射分析是利用晶体形成的X射线衍射,对物质内部原子在空间分布状况进行分析的方法。将具有一定波长的X射线照射到结晶性物质上时,X射线因在结晶内遇到规则排列的原子或离子而发生散射,散射的X射线在某些方向上相位得到加强,从而显示与结晶结构相对应的特有的衍射现象。X-衍射分析表明(图5),橙皮苷具有尖锐的晶体衍射峰;而HP-β-CD作为一种无定形物质存在,没有尖锐的衍射峰。在二者的物理混合物中,橙皮苷尖锐的晶体衍射峰仍然清晰可见,但在包合物中却突然消失。这表明橙皮苷已完全分散在HP-β-CD中,与HP-β-CD形成了一种无定形物质^[12]。

2.6 橙皮苷及其包合物的水溶解度

橙皮苷是由一分子橙皮素与一分子的二糖缩水结合而成,虽然结构中包含有糖基,但其在水中的溶解

度却很低。高效液相色谱分析(图6)表明,橙皮苷在30℃水中的溶解度为34.68 μg/mL;而通过与HP-β-CD的包合后,橙皮苷在水中的溶解度可增加至2049.50 μg/mL,水溶性和稳定性得到显著提高。

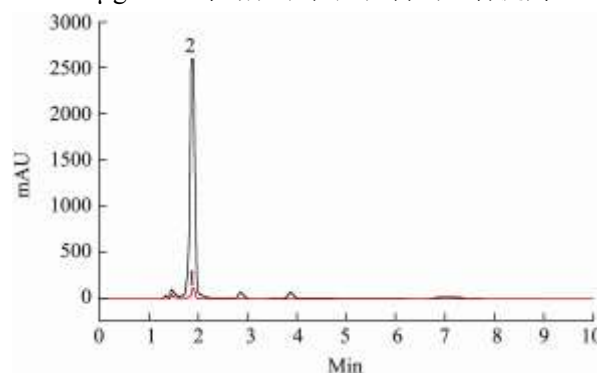


图6 橙皮苷(1)及其包合物(2)在水中溶解度的比较

Fig.6 Solubility comparison of hesperidin (1) and its complex (2) in water

3 结论

橙皮苷来源广泛,具有良好的生物活性,在功能性食品及医药领域具有广阔的应用前景。本文采用溶剂法制备了橙皮苷/HP-β-CD包合物,经紫外、红外、电镜、X-射线衍射、差示扫描量分析表明,与HP-β-CD包合后橙皮苷的物相发生了重大改变。橙皮苷在包合物中以无定形状态存在,与HP-β-CD以非共价键形式相结合,二者之间有氢键或范德华力之类的作用力存在。同时,经高效液相色谱法分析可知,橙皮苷在水中的溶解度由34.68 μg/mL增加至2049.50 μg/mL,其水溶性得到显著提高。

参考文献

- [1] Saeidi I, Hadjmohammadi M R, Peyrovi M, et al. HPLC determination of hesperidin, diosmin and eriocitrin in Iranian lime juice using polyamide as an adsorbent for solid phase extraction [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011, 56(2): 419-422
- [2] Ma Y, Ye X, Hao Y, et al. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (Citrus reticulata) peel [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2008, 15(3): 227-232
- [3] Inoue T, Tsubaki S, Ogawa K, et al. Isolation of hesperidin from peels of thinned Citrus unshiu fruits by microwave-assisted extraction [J]. Food Chemistry, 2010, 123(2): 542-547
- [4] Kalpana K B, Devipriya N, Srinivasan M, et al. Evaluating the radioprotective effect of hesperidin in the liver of Swiss albino mice [J]. European Journal of Pharmacology, 2011,

- 658(2-3): 206-212
- [5] Martínez A L, González-Trujano M E, Chávez M, et al. Hesperidin produces antinociceptive response and synergistic interaction with ketorolac in an arthritic gout-type pain in rats [J]. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2011, 97(4): 683-689
- [6] Park H J, Kim M J, Ha E, et al. Apoptotic effect of hesperidin through caspase3 activation in human colon cancer cells, SNU-C4 [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15(1-2): 147-151
- [7] Ahmad S T, Arjumand W, Nafees S, et al. Hesperidin alleviates acetaminophen induced toxicity in wistar rats by abrogation of oxidative stress, apoptosis and inflammation [J]. *Toxicology Letters*, 2012, 208(2): 149-161
- [8] Nguyen T A, Liu B, Zhao J, et al. An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex [J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(1): 186-192
- [9] Liu B, Nguyen, T A, Zhao J. Empirical, thermodynamic and quantum-chemical investigations of inclusion complexation between flavanones and (2-hydroxypropyl)- cyclodextrins [J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(2): 926-932
- [10] Yuan C, Jin Z, Xu Y. Inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: UV, FTIR, ^1H NMR and molecular modeling studies [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 89(2): 492-496
- [11] Liu B, Zhao J, Liu Y, et al. Physicochemical properties of the inclusion complex of puerarin and glucosyl- β - cyclodextrin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(51): 12501-12507
- [12] Lasonder E, Weringa W D. An NMR and DSC study of the interaction of phospholipids vesicles with some anti-inflammatory agents [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1990, 139(2): 469-478