

文章编号:1673-2383(2019)03-0086-04

网络出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1378.N.20190614.1645.030.html>

网络出版时间:2019-6-14 16:46:26

漆黄素与环糊精的相互作用研究

毛善勇¹, 李向阳², 李刚^{3*}

(1. 广州金至检测技术有限公司, 广东 广州 510330; 2. 新乡职业技术学院, 河南 新乡 453006;
3. 河南科技学院, 河南 新乡 453003)

摘要:漆黄素具有抗氧化、降肿瘤等多种生物活性功能,但在水中溶性低、稳定性差的缺点制约了它在医药、化妆品和食品中的应用,而采用环糊精包埋是一条可行之路。采用相溶解度法比较了 α -环糊精(α -CD)、 β -环糊精(β -CD)、 γ -环糊精(γ -CD)和麦芽糖- β -环糊精(M- β -CD)对漆黄素的包埋效果。在此基础上制备了漆黄素与 M- β -CD 的复合物,运用紫外(UV)、红外(IR)及 X 射线衍射(XRD)方法对其结构进行了表征,并采用分子对接法建立了漆黄素与环糊精复合物的三维超分子结构。结果表明:M- β -CD 和 β -CD 对漆黄素的包合效果接近,显著优于 α -CD 和 γ -CD。漆黄素与 M- β -CD 复合后,其物相发生了重大改变,分子对接分析表明,漆黄素沿 M- β -CD 的大口端方向进入其空腔形成复合物,该超分子结构可能通过氢键维持。

关键词:漆黄素;环糊精;复合物;相互作用;分子对接

中图分类号:TS201.2

文献标志码:B

0 引言

漆黄素(Fisetin)为黄酮类物质,主要存在于漆树科植物木蜡树中^[1-2]。近年来的研究表明漆黄素具有抗氧化、维护心脑血管、抗抑郁、护肝、抗肿瘤和抗衰老等多种生物活性功能^[3-5],在化妆品、功能性食品及医药领域有很好的应用前景,但在水中溶性低、稳定性差的缺点限制了它的应用范围。环糊精(cyclodextrin, CD)是由多个葡萄糖残基通过 α -1,4 糖苷键相连接而成的环式低聚糖,其内部为疏水性空腔,外部为亲水性表面。该特殊结构使环糊精可包合众多疏水性小分子,提高其水溶性^[6-8]。常见的环糊精是由 6、7 和 8 个葡萄糖残基组成的 α -、 β -和 γ -CD,而麦芽糖基- β -环糊精(M- β -CD)是 β -环糊精的一种酶法衍生物,具有高安全性和水溶性的特点^[9-10],有关其包合物的研究鲜见报道。对漆黄素采用化学和酶法修饰,提高其水溶性

的策略并不适合当前的食品工业,环糊精包合具有高安全性、低成本的优点,有望克服漆黄素的应用瓶颈,但目前尚无环糊精包合漆黄素的系统研究,鉴于此,作者采用相溶解度法比较了 α -CD、 β -CD、 γ -CD 和 M- β -CD 包埋效果。在此基础上,制备了根皮苷与 M- β -CD 的复合物,运用紫外(UV)、红外(IR)及 X-射线衍射(XRD)技术对其结构进行了表征,并采用分子对接法建立了漆黄素与环糊精复合物的三维超分子结构,以期为漆黄素和 M- β -CD 的应用与推广提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

漆黄素(纯度 98%)、麦芽糖- β -环糊精(纯度 98%):上海晶纯生化科技股份有限公司;甲醇(色谱纯):美国 Tedia 公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪 器

1260 型高效液相色谱:美国 Agilent 公司;Q200 型差示扫描量热仪:美国 TA 公司;TEN-SOR27 型红外光谱仪:德国 Bruker 公司;Alpha1-2LD 型冷冻干燥机:德国 CHRIST 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。

收稿日期:2019-01-29

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(19A550009)

作者简介:毛善勇(1978—),男,浙江江山人,硕士,研究方向为食品、药品、日化产品分析与检测。

* 通信作者:李刚,讲师,E-mail:lg760925@163.com

1.3 相溶解度测定方法

按照参考文献[11]的方法进行相溶解度测定。向 5 mL 不同浓度的 α -CD、 β -CD、 γ -CD 和 M- β -CD 溶液(0~10 mmol/L)中分别加入 20 mg 漆黄素,并将其置于 25 °C 水浴中振荡 72 h,过滤后适当稀释,采用紫外法测定上清液中的漆黄素含量。根据标准曲线计算相应环糊精浓度下的漆黄素的溶解度,绘制相溶解度线,根据 Higuchi-Connors 方程计算表观稳定常数(K_s)。

$$K_s = \frac{S}{I(1-S)}$$

式中: S 为相溶解度线的斜率, I 为漆黄素的原有溶解度。

1.4 包合物和物理混合物的制备

将 0.286 g 漆黄素与 1.459 g M- β -CD 加入 25 mL 纯水中,并在 25 °C 水浴中振荡 72 h,离心,上清液冷冻干燥,所得固体为漆黄素/M- β -CD 复合物。漆黄素和 M- β -CD 在相同比例下置于研钵中混合混匀,得漆黄素/M- β -CD 物理混合物。

1.5 紫外测定方法

取适量的漆黄素、M- β -CD、二者的物理混合物及复合物溶于纯水中,测定其在 220~400 nm 的紫外吸收光谱。

1.6 红外测定方法

取适量的漆黄素、M- β -CD、二者的物理混合物及复合物,分别与溴化钾混合均匀压片,置于红外光谱仪中,测定其在 4 000~400 cm^{-1} 的红外吸收光谱。

1.7 差示扫描量热方法

分别称取 2 mg 左右的漆黄素、M- β -CD、二者的物理混合物及复合物,密封于坩埚中,放入差示扫描量热仪中,在氮气环境下测定收集 40~350 °C 的差示扫描量数据,测定中的升温速率为 10 °C/min。

1.8 分子对接方法

参照文献[10]的方法,采用 Hyperchem 软件构造和优化漆黄素和 M- β -CD 结构,利用 AUTODOCK4.2 分子模拟软件对漆黄素和 M- β -CD 进行分子对接,设定 autogrid box 参数 60 Å×60 Å×60 Å,grid spacing 设置为 0.375 Å;选择计算方法为 Lamarckian genetic algorithm (LGA),其他参数默认设置。

2 结果与分析

2.1 相溶解度试验

相溶解度法可以反映主体分子对客体分子的结合能力,被广泛用于环糊精的研究^[12],用该法考

察了 α -CD、 β -CD、 γ -CD 和 M- β -CD 对漆黄素的增溶效果。如图 1 所示,随着环糊精浓度的上升,漆黄素在水中的溶解度也线性上升,表现为 AL 型,表明各环糊精均可与漆黄素按 1:1 结合^[13]。 α -CD、 β -CD、 γ -CD 和 M- β -CD 与漆黄素的稳定常数分别为 130、860、795 和 961,M- β -CD 和 β -CD 对漆黄素的包合效果接近,显著优于 α -CD 和 γ -CD。这可能是由于 α -CD 的孔径较小,漆黄素进入困难,而 γ -CD 孔径过大,漆黄素较难与之稳定结合。M- β -CD 和 β -CD 具有相近的孔径,适合包合漆黄素,因而效果较好。

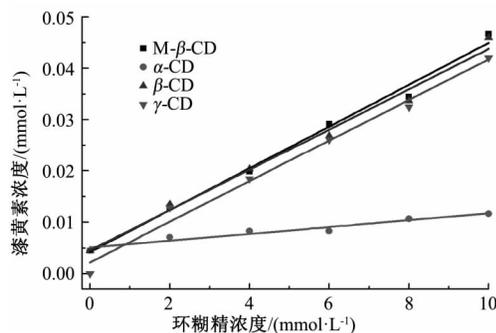
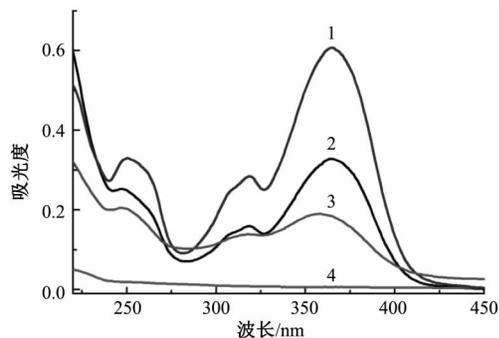


图 1 漆黄素与环糊精的相溶解度

Fig.1 Phase-solubility diagram between fisetin and CDs

2.2 紫外光谱分析

紫外光谱是研究环糊精及其客体分子间相互作用的最常用的手段。漆黄素、M- β -CD、二者混合物和复合物的紫外图谱如图 2 所示。漆黄素具有典型的苯并吡喃酮结构,最大紫外吸收峰在 365 nm 处。M- β -CD 为环状寡糖结构,无明显紫外吸收峰。而二者混合物和复合物的紫外图谱相同,最大紫外吸收峰均在 365 nm 处,说明包合过程中漆黄素与 M- β -CD 没有发生共价结合。



注:1.漆黄素;2.混合物;3.复合物;4.M- β -CD。下同。

图 2 紫外分析结果

Fig.2 Results of UV analysis

2.3 红外光谱分析

红外光谱可以反映包合过程中的基团变化情况。如图3所示,漆黄素具有典型的酚羟基、羰基,苯环等特征峰,M- β -CD则具有羟基、糖环等特征吸收峰。漆黄素和M- β -CD混合物的红外光谱为二者红外光谱的直接叠加。而二者复合物的图谱发生了明显的变化,保留了M- β -CD的大部分吸收峰,而根皮苷的特征峰基本消失,表现为M- β -CD特征,表明漆黄素已完全分散于M- β -CD基质中。

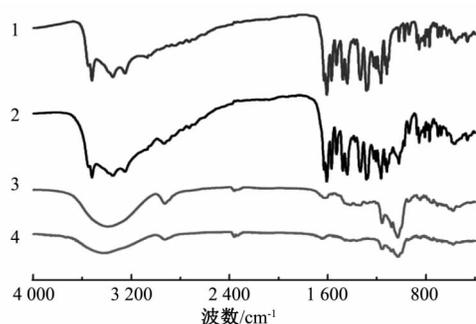


图3 红外分析结果

Fig.3 Results of IR analysis

2.4 差示扫描量热分析

差示扫描量热法通过对样品的程序控温,考察其吸热、放热以及热容的改变量等热转变过程,该法是验证包合物形成的较有效方法之一。如图4所示,漆黄素在103℃处开始有吸热峰,由其水分挥发引起,335℃处开始有一强吸收峰,与其熔点对应,为漆黄素熔化所致二者物理混合物的DSC图谱,主要表现为漆黄素和M- β -CD图谱的简单叠加。对于包合物的DSC图谱,漆黄素的吸热峰完全消失,样品呈现出M- β -CD的特征,表明漆黄素已完全分散在M- β -CD中,并且它们之间存在着氢键或范德华力等作用力^[14]。

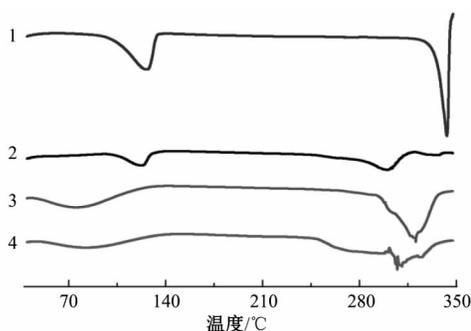


图4 DSC分析结果

Fig.4 Results of DSC analysis

2.5 分子对接分析

分子对接研究可反映主体分子和客体分子之

间的相互结合过程,被广泛用于蛋白与药物小分子的相互作用研究^[15]。本研究中通过将漆黄素分子置于环糊精疏水性空腔的不同部位,测定对应的结合能,可以获得二者最适的结合构象。图5展示了漆黄素与各型环糊精复合物的最适结合模式,漆黄素沿CD的大口端方向进入其疏水性空腔内,其A环完全进入疏水空腔内,漆黄素通过其A环上的酚羟基以氢键与环糊精相结合。 α -CD、 β -CD、 γ -CD和M- β -CD与漆黄素的结合能分别为-25.61、-26.95、-25.98、-27.70 kJ/mol,表明环糊精与漆黄素的结合能力的顺序如下:M- β -CD> β -CD> γ -CD> α -CD,这与相溶解度试验结果相一致。

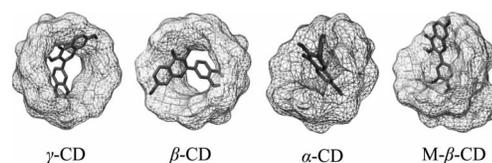


图5 漆黄素/CD的复合物的三维超分子结构

Fig.5 The three-dimensional supermolecular structures of fisetin/CD complexes

3 结论

本研究系统比较了 α -CD、 β -CD、 γ -CD和M- β -CD对漆黄素的包合效果,在此基础上制备了漆黄素与M- β -CD的复合物,运用紫外、红外、差示量热扫描技术对其结构进行了表征,并采用分子对接法建立了漆黄素与各型环糊精复合物的三维超分子结构。结果表明:M- β -CD和 β -CD对漆黄素的包合效果接近,显著优于 α -CD和 γ -CD。漆黄素与M- β -CD复合后,其物相发生了重大改变,分子对接分析表明:漆黄素沿M- β -CD的大口端方向进入其空腔形成复合物,该超分子结构可能通过氢键维持。

参考文献:

- [1] 陈虹霞,王成章,叶建中,等.漆树木材中漆黄素的分离及其抑制酪氨酸酶活性的研究[J].林产化学与工业,2015,35(6):101-107.
- [2] 徐娜,许凯扬,方芳,等.聚酰胺分离纯化黄芩叶漆黄素工艺研究[J].食品与机械,2017,33(12):160-163.
- [3] DONG B,LIU C,XUE R,et al. Fisetin inhibits cardiac hypertrophy by suppressing oxidative stress[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry,2019,62:221-229.

- [4] KASHYAP D, SHARMA A, SAK K, et al. Fisetin: A bioactive phytochemical with potential for cancer prevention and pharmacotherapy [J]. *Life Sciences*, 2018, 194: 75–87.
- [5] CHO Y, CHUNG J H, DO H J, et al. Effects of fisetin supplementation on hepatic lipogenesis and glucose metabolism in Sprague–Dawley rats fed on a high fat diet [J]. *Food Chemistry*, 2013, 139(1–4): 720–727.
- [6] SUVARNA V, GUJAR P, MURAHARI M. Complexation of phytochemicals with cyclodextrin derivatives –An insight [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 88: 1122–1144.
- [7] PINHO E, GROOTVELD M, SOARES G, et al. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 101: 121–135.
- [8] 张严, 苏志, 桂张灿. β -环糊精及衍生物作为生物活性分子研究进展 [J]. *药学研究*, 2018, 37(10): 589–592.
- [9] 崔波, 金征宇. 麦芽糖基(α -1 \rightarrow 6) β -环糊精的酶法合成和结构鉴定 [J]. *高等学校化学学报*, 2007, 28(2): 283–285.
- [10] 范新景, 袁超, 李嘉琪, 等. 根皮苷与麦芽糖基- β -环糊精复合物的理化性质研究 [J]. *现代食品科技*, 2016, 32(3): 106–112.
- [11] LIU B, LI W, ZHAO J, et al. Physicochemical characterisation of the supramolecular structure of luteolin/cyclodextrin inclusion complex [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(2): 900–906.
- [12] 刘本国, 张瑞婷, 吴晓楠, 等. 橙皮苷/羟丙基- β -环糊精包合物的理化性质研究 [J]. *现代食品科技*, 2013, 29(10): 2349–2352.
- [13] STRAŽIŠAR M, ANDRENŠEK S, ŠMIDOVNIK A. Effect of β -cyclodextrin on antioxidant activity of coumaric acids [J]. *Food Chemistry*, 2008, 110(3): 636–642.
- [14] 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(2): 12501–12507.
- [15] MORRIS M, HUEY R, LINDSTROM W, et al. Autodock4 and autodocktools4: automated docking with selective receptor flexibility [J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2010, 30(16): 2785–2791.

Interaction between Fisetin and Cyclodextrins

MAO Shanyong¹, LI Xiangyang², LI Gang³

(1. *Guangzhou King Test technology Co., Ltd., Guangzhou 510330, China;*

2. *Xinxiang Vocational and Technical College, Xinxiang 453006, China;*

3. *Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)*

Abstract: Fisetin possesses many health-promoting properties, such as antioxidant, anticancer activities. Its poor solubility and stability in water limit its application in medicines, cosmetics and foods. Its shortcomings can be overcome by complexing with cyclodextrins (CDs). But there is no systematic report about its interaction with CDs. In view of this, the effect of α -cyclodextrin (α -CD), β -cyclodextrin (β -CD), γ -cyclodextrin (γ -CD) and maltosyl- β -cyclodextrin (M- β -CD) on the aqueous solubility of fisetin was compared by the phase solubility method. Then, the complex of fisetin and M- β -CD was prepared and characterized by using ultraviolet-visible spectrum (UV), ultraviolet-visible spectrum (IR) and X-ray diffraction (XRD). Based on the experimental results, the three-dimensional supermolecular structures of fisetin/CD complexes was established by using molecular docking method. It was found that the inclusion effects of M- β -CD and β -CD on fisetin were higher than those of α -CD and β -CD. After complexing with M- β -CD, the physicochemical properties of fisetin were significantly changed, which were completely dispersed in M- β -CD. The molecular docking analysis suggested that fisetin entered the hydrophobic cavity from the wide rim of M- β -CD, and the complex was maintained by hydrogen bonding.

Key words: fisetin; cyclodextrin; complex; interaction; molecular docking