

水溶性芦丁/羟丙基-β-环糊精包合物的制备及其抗氧化活性、稳定性研究

张生鹏, 张根义

Preparation of Water-soluble Rutin/Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin Inclusion Complex and Its Antioxidant Activity and Stability Studies

ZHANG Shengpeng and ZHANG Genyi

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023080182>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

叶黄素酯/α-环糊精包合研究

Evaluation of α-cyclodextrin inclusion compound of lutein esters

食品工业科技. 2017(15): 102-106 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.15.020>

芸香苷-羧甲基-β-环糊精包合物的制备及其表征

Preparation and characterization of the rutin-CM-β-CD inclusion complex

食品工业科技. 2017(21): 197-202 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.21.039>

肉桂精油/羟丙基-β-环糊精包合物对κ-卡拉胶质构和流变特性的影响

Influence of Cinnamon Essential Oil/Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin Inclusion Complex on Texture and Rheological Properties of κ-Carrageenan

食品工业科技. 2019, 40(20): 61-65 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.20.010>

姜黄素超分子包合物的结构鉴定及其抗氧化活性

Structural identification of curcumin/β-cyclodextrin polymer inclusion complex and its antioxidant activity

食品工业科技. 2017(21): 21-25 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.21.005>

响应面优化羟丙基-β-环糊精对血根碱的包合工艺

Optimization for Inclusion Technology of Sanguinarine HP-β-CD Inclusion Complex by Response Surface Methodology

食品工业科技. 2020, 41(18): 182-186 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.18.029>

β-环糊精提高乳酸菌发酵大麦粉提取物的抗氧化及结构稳定性研究

The improvement of antioxidant and structural stability of fermented barley extract with Lactobacillus plantarum with β-cyclodextrin

食品工业科技. 2017(10): 146-150 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.10.020>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

张生鹏, 张根义. 水溶性芦丁/羟丙基- β -环糊精包合物的制备及其抗氧化活性、稳定性研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(13): 99–107. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080182

ZHANG Shengpeng, ZHANG Genyi. Preparation of Water-soluble Rutin/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complex and Its Antioxidant Activity and Stability Studies[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(13): 99–107. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080182

· 研究与探讨 ·

水溶性芦丁/羟丙基- β -环糊精包合物的制备及其抗氧化活性、稳定性研究

张生鹏, 张根义*

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214000)

摘要: 芦丁具有多种药理活性, 为解决其水溶性差导致的应用缺陷。本文通过溶剂蒸发法制备了芦丁/羟丙基- β -环糊精 (Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, HPCD) 包合物, 分析了包合物的结构、溶解性、抗氧化活性和稳定性。结果表明, HPCD 能够有效包埋芦丁, 包合物中二者摩尔比为 1:1, 其包封率和载药率分别为 89.33%、26.67%, 包合物在水中的溶解度是游离芦丁的 51 倍。芦丁被包合后, 其晶体衍射峰完全消失, 提高了最大失重速率温度 (266 °C 到 318 °C), 且固态包合物呈现出不规则的片状结构, 表明 HPCD 成功包合了芦丁。包合物清除 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基的 IC₅₀ 显著低于芦丁 ($P < 0.05$), 并且其铁离子还原能力是芦丁的 1.2 倍。稳定性实验表明, 自然光处理 6 d 后游离芦丁和包合芦丁保留率分别为 31.80%、66.70%, 50 °C 热处理 15 d 后保留率分别为 66.91%、87.38%。因此 HPCD 不仅提高了芦丁的水溶性, 也提升了其抗氧化活性和稳定性, 使芦丁可在不同环境中发挥其保健功能。

关键词: 芦丁, 羟丙基- β -环糊精, 包合物, 溶解度, 抗氧化活性, 稳定性

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)13-0099-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080182



本文网刊:

Preparation of Water-soluble Rutin/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complex and Its Antioxidant Activity and Stability Studies

ZHANG Shengpeng, ZHANG Genyi*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214000, China)

Abstract: Rutin has a variety of pharmacological activities, in order to solve the application defects caused by its poor water solubility. In this paper, rutin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPCD) inclusion complexes were prepared by solvent evaporation method and analysed for structure, solubility, antioxidant activity and stability. The analysis of the inclusion complex showed that HPCD could effectively encapsulate rutin in a molar ratio of 1:1, and its encapsulation efficiency and drug loading rate were 89.33% and 26.67%, respectively. The solubility of the inclusion complex in water was 51 times higher than that of rutin. After complexation, the crystal diffraction peaks of rutin disappeared and the temperature of the maximum weight loss increased from 266 °C to 318 °C and solid inclusion complex forms showed an irregular sheet-like structures indicating a successful complexation of rutin by HPCD. The IC₅₀ of the inclusion complex for scavenging DPPH radicals and ABTS cationic radicals was significantly lower than that of rutin ($P < 0.05$), and its ferric ion reduction capacity was 1.2 times that of rutin. The stability study also showed a higher retention rate of rutin in the inclusion complex after exposure to natural light for 6 days (31.80%, 66.70%) or heat treatment at 50 °C for 15 days (66.91%, 87.38%). The complexation of rutin by HPCD significantly improved its solubility, antioxidant activity and stability, which could be used in different environments to exert its health functions.

收稿日期: 2023-08-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32172199)。

作者简介: 张生鹏 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程, E-mail: 673576959@qq.com。

* 通信作者: 张根义 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养学, E-mail: genyiz@gmail.com。

Key words: rutin; hydroxypropyl- β -cyclodextrin; inclusion complex; solubility; antioxidant activity; stability

芦丁(Rutin)又名芸香苷,化学名称为 5,7,3',4'-四羟基-3-芸香糖黄酮,分子式为 $C_{27}H_{30}O_{16}$,分子量 610.52 g/mol,是一种天然的黄酮衍生物,广泛存在于芸香、烟叶、荞麦、槐等植物的根、茎、叶、花、果实、种子中^[1-2]。芦丁已被证明有多种药理活性,包括抗炎、抗菌、抗癌、神经保护、抗血栓和抗病毒活性^[3]。芦丁是一种重要的生物活性物质,在许多功能性食品、保健品和医药产品中具有潜在的应用前景。然而,这种植物化学物质的一个主要问题是其水溶性差,严重限制了其应用的范围^[4]。因此,提高芦丁溶解度是改善其应用缺陷的关键问题。

环糊精是食品加工常用于包埋脂溶性或风味物质的食品添加剂,呈锥形结构,其中间有一个空腔,具有内疏水、外亲水的性质^[5]。 α -、 β -和 γ -环糊精分别由 6、7 和 8 个葡萄糖残基组成^[6]。 β -环糊精因其高性价比是目前工业上唯一大量生产且广泛应用的环糊精,芦丁/ β -环糊精包合物的形成可使芦丁的溶解度提升 35 倍^[7]。但 β -环糊精因分子内氢键使其在水中的溶解度受限,且 β -环糊精有溶血作用限制了其应用。羟丙基- β -环糊精(HPCD)是 β -环糊精的醚化衍生物,比 β -环糊精有更高的水溶性和更低的毒性,对于大部分 β -环糊精可以包埋的客体来说是更好的选择^[8],然而目前国内鲜有关于 HPCD 包埋芦丁的报道,故系统地研究芦丁/HPCD 包合物的制备、结构特征、性质对芦丁的应用推广具有重要价值。

本实验通过溶剂蒸发法制备了芦丁/HPCD 包合物,运用光学和热分析仪器对包合物进行表征,并对包合物(Inclusion complex, IC)的水溶性、抗氧化活性、稳定性展开研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

芦丁($\geq 95\%$)、羟丙基- β -环糊精($\geq 98\%$)、亚硝酸钠(AR)、九水合硝酸铝(AR)、氢氧化钠(AR)、丙二醇(AR)、硫酸(GR)、无水乙醇(GR)、抗坏血酸(AR)、过二硫酸钾(AR)、七水合硫酸亚铁(AR)、乙酸(AR)、无水三氯化铁(CP) 国药集团化学试剂有限公司;水合茚三酮($\geq 99\%$) 北京伊诺凯科技有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 东京化成工业株式会社;2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 美国 Sigma-Aldrich 公司;2,4,6-三吡啶基三嗪($\geq 99\%$) 上海阿拉丁试剂有限公司。

UV-1800 紫外可见分光光度计 岛津(上海)实验器材有限公司;ZNCL-GS 240×150 磁力搅拌水浴锅 重庆君瑜兴科技有限公司;SCIENTZ-10ND 冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司;D2 PHASER 型 X-射线衍射仪 德国布鲁克 AXS 有限公司;IS10 傅里叶红外光谱仪 美国 Nicolet 公司;TGA2 热重分析仪 梅特勒-托利多仪器有限公司;

Dino-Lite 光学显微镜 微迪光学有限公司;SU8100 冷场发射扫描电子显微镜 日本株式会社日立高新技术;Synergy LX 酶标仪 BioTeK Instruments;DHG-9070A 电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 HPCD 取代度和相对分子质量测定 根据文献 [9-10] 的方法并稍作修改测定 HPCD 的取代度和相对分子质量。用蒸馏水配制 10、20、30、40、50 $\mu\text{g/mL}$ 的 1,2-丙二醇标液。取 0.4 mL 的 1,2-丙二醇标液于 10 mL 具塞比色管中,另取 0.4 mL 蒸馏水于同样比色管中做空白,冰浴中缓慢加入 3.2 mL 浓硫酸,混匀后放入 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 3 min,立即重新放入冰浴,沿壁加 0.24 mL 的 3% 水合茚三酮溶液,立即摇匀,然后放入 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 100 min,用浓硫酸稀释至刻度,将管倒置几次混合,静置 5 min,于 595 nm 处测定吸光值,绘制标准曲线,标准曲线的回归方程为: $y=0.2521x-0.0074$ ($R^2=0.9921$)。HPCD 按照同样的方法在 595 nm 处测定吸光值(1,2-丙二醇替换为 HPCD),根据公式(1)计算 HPCD 的取代度(Degree of substitution, DS),然后根据公式(2)求得 HPCD 的分子量。

$$DS = \frac{1135 \times [(C \times F \times V) / (1000 \times 76)]}{[m - 58 \times (C \times F \times V) / (1000 \times 76)]} \quad \text{式 (1)}$$

式中:DS 为 HPCD 取代度;1135 为 β -环糊精分子量;C 为 HPCD 从标准曲线上查得对应的 1,2-丙二醇的浓度, $\mu\text{g/mL}$;F 为显色反应体系中 HPCD 的稀释倍数;V 为配制的 HPCD 溶液体积, mL;1000 为 μg 与 mg 之间的转化倍数;m 为 HPCD 的质量, mg;76 为 1,2-丙二醇的相对分子质量;58 为羟丙基的分子量减氢原子分子量。

$$M_{(\text{HPCD})} = 1135 + 58 \times DS \quad \text{式 (2)}$$

式中:M 为 HPCD 分子量。

1.2.2 芦丁/HPCD 包合物和物理混合物的制备 根据文献 [11] 的方法并稍作修改制备芦丁/HPCD 包合物。根据计算得到的 HPCD 分子量,制备 0.49 mmol/L 的 HPCD 水溶液 500 mL,0.49 mmol/L 的芦丁乙醇溶液 500 mL,将芦丁溶液缓慢加入到水浴搅拌的 HPCD 溶液中(35 $^{\circ}\text{C}$, 350 r/min),二者充分混合后保持温度和搅拌速率不变,持续搅拌 24 h 使乙醇挥发,之后在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、350 r/min 下继续搅拌 12 h,搅拌期间避免阳光直射。搅拌结束后将混合液通过 0.45 μm 过滤器除去未溶解的固体,所得溶液即为芦丁/HPCD 包合物溶液。将包合物溶液在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻 12 h,然后放入冷冻干燥机冻干 72 h 即可得到包合物固体粉末。

将 HPCD 和芦丁按照摩尔比 1:1 的比例在研钵

中混合, 制成均匀的芦丁/HPCD 物理混合物 (Physical mixture, PM)。

1.2.3 芦丁/HPCD 包合物的包封率、载药率、溶解度 采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色法定量分析包合物中芦丁的含量^[12-13], 用 60% 乙醇精确配制 0.2 mg/mL 芦丁标准溶液, 准确吸取芦丁标准溶液 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加入 50 g/L 的 NaNO_2 溶液 0.4 mL, 摇匀后放置 6 min, 加入 100 g/L 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.4 mL, 摇匀后放置 6 min, 加 40 g/L 的 NaOH 溶液 4 mL, 用 60% 乙醇定容至刻度, 摇匀放置 15 min。以芦丁含量为零的溶液做空白, 测定各组溶液在 510 nm 吸光度, 以吸光值为纵坐标, 芦丁浓度 (mg/mL) 为横坐标绘制标准曲线, 标准曲线的回归方程为 $y = 11.8475x - 0.0161$ ($R^2 = 0.9992$)。包合物按同样的方法在 510 nm 处测定吸光度, 带入标准曲线, 计算包合物中芦丁含量。

根据文献 [14-15] 方法并稍作修改研究包合物的包封率、载药率。用前述方法制备包合物溶液, 用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色法测定溶液中芦丁含量, 根据公式(3)和公式(4)计算包封率和载药率:

$$\text{包封率}(\%) = \frac{C_1 \times V_1}{M_2} \times 100 \quad \text{式 (3)}$$

式中: C_1 为包合物溶液中芦丁的质量浓度, mg/mL; V_1 为包合物溶液的体积, mL; M_2 为芦丁的初始质量, mg。

$$\text{载药率}(\%) = \frac{C_1 \times V_1}{M_1 + M_2} \times 100 \quad \text{式 (4)}$$

式中: C_1 为包合物溶液中芦丁的质量浓度, mg/mL; V_1 为包合物溶液的体积, mL; M_1 为 HPCD 的初始质量, mg; M_2 为芦丁的初始质量, mg。

根据文献 [16] 方法并稍作修改研究芦丁被 HPCD 包合后的溶解度。100 mg 芦丁和相同芦丁含量的包合物固体粉末置于 10 mL 蒸馏水中, 在 25 °C、300 r/min 的磁力搅拌水浴锅中搅拌 60 h, 离心管用铝箔覆盖, 以最大限度地减少芦丁的光诱导降解。之后通过 0.45 μm 过滤器除去未溶解的固体, 用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色法测定溶液中芦丁含量。

1.2.4 芦丁/HPCD 包合物的相溶解度研究 根据文献 [17] 的方法并稍作修改研究包合物的相溶解度, 根据计算得到的 HPCD 分子量, 分别制备 250 mL 不同摩尔浓度的 HPCD 水溶液 (0~10 mmol/L), 向其中分别加入 250 mg 芦丁, 然后置于 25.0 °C 的磁力搅拌水浴锅中, 以 600 r/min 的速度搅拌混合物 60 h, 之后将样品通过 0.45 μm 过滤器除去未溶解的芦丁, 用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色法测定溶液中芦丁含量。结合相溶解度图像, 根据公式(5)计算包合物的稳定常数 (K_s), 计算公式为:

$$K_s = \frac{k}{S_0(1-k)} \quad \text{式 (5)}$$

式中: S_0 是 HPCD 浓度为 0 时芦丁在水中的溶解量, mmol/L; k 是相溶解度图的斜率。

包合过程中的吉布斯自由能 (ΔG) 的变化由 K_s 值根据公式(6)确定。

$$\Delta G = -RT \ln(K_s) \quad \text{式 (6)}$$

式中: R 是通用气体常数, 8.314 J/(mol·K); T 为实验温度 (298.15 K)。

1.2.5 芦丁/HPCD 包合物的表征

1.2.5.1 X 射线衍射 (X-ray diffraction, XRD) 分别对 HPCD、芦丁、包合物、物理混合物的固体粉末进行 X 射线衍射分析, 测试条件: Cu 靶, $K\alpha$ 辐射源 (1.542 Å), 电压 40 kV, 扫描范围 5°~50°, 步长 0.02°。

1.2.5.2 傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 分别对 HPCD、芦丁、包合物、物理混合物的固体粉末进行傅里叶变换红外光谱分析, 在 4000~600 cm^{-1} 范围内记录光谱, 分辨率为 4 cm^{-1} , 扫描 64 次。

1.2.5.3 热重分析 (Thermogravimetry analysis, TGA)

通过热重分析研究芦丁被包合后的热力学性质, 称取 2~5 mg 样品粉末于 70 μL 坩埚中, 盖好坩埚盖以防止样品污染 TGA 腔体。操作条件: 加热温度范围为 40~600 °C, 升温速率为 10 °C/min, 氮气的流速为 40 mL/min。

1.2.5.4 形貌分析 使用 Dino-Lite 光学显微镜观察样品的形貌特征; 采用扫描电子显微镜 (Scanning electron microscope, SEM) 对样品进一步观察, 取干燥后的样品粉末平铺粘在导电双面胶上, 吹去多余样品, 在真空条件下, 进行镀金处理, 然后将其置于扫描电子显微镜中, 拍摄样品颗粒表面形貌图像。

1.2.6 芦丁/HPCD 包合物的抗氧化能力

1.2.6.1 DPPH 自由基清除能力 根据文献方法并稍作调整来测定样品的 DPPH 自由基清除能力^[18-19]。取芦丁和包合物的水溶液用水稀释, 稀释后芦丁浓度分别为 5、10、20、30、40 μg/mL, 之后取 200 μL 样品于 1.5 mL 棕色离心管中, 加入 300 μL 的 DPPH 自由基-无水乙醇溶液 (0.1 mmol/L), 振荡混匀, 最终体系中芦丁的浓度分别为 2、4、8、12、16 μg/mL, 避光反应 30 min, 使用酶标仪在 517 nm 测定溶液吸光度, 以维生素 C (V_C) 作为阳性对照, 根据公式(7)计算 DPPH 自由基清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{B_1 - B_0}{A_1}\right) \times 100 \quad \text{式 (7)}$$

式中, A_1 为 DPPH 自由基的吸光度 (不含样品); B_1 为样品与 DPPH 自由基的吸光度; B_0 为样品的吸光度 (不含 DPPH 自由基); DPPH 自由基清除能力用 IC_{50} 表示。

1.2.6.2 ABTS⁺ 自由基清除能力 根据文献方法并

稍作调整来测定样品的 ABTS 阳离子自由基清除能力^[20]。将 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液加入到 7 mmol/L 的 ABTS 溶液中 (v/v=1:1), 避光反应 12~16 h 得到 ABTS 溶液, 然后用去离子水稀释, 使其在 734 nm 的吸光值达到 0.7(±0.02)。取芦丁和包合物的水溶液用水稀释, 稀释后芦丁的浓度分别为 5、10、20、30、40 μg/mL, 之后取 200 μL 样品于 1.5 mL 棕色离心管中, 加入 300 μL 的 ABTS 溶液振荡混匀, 最终体系中芦丁的浓度分别为 2、4、8、12、16 μg/mL, 避光反应 30 min 后使用酶标仪在 734 nm 测定溶液吸光度, 以 V_C 作为阳性对照, 根据公式(8)计算 ABTS⁺自由基清除率:

$$\text{ABTS}^+ \text{自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{B_1 - B_0}{A_1}\right) \times 100 \quad \text{式(8)}$$

式中, A_1 为 ABTS 溶液的吸光度(不含样品); B_1 为样品与 ABTS 溶液的吸光度; B_0 为样品的吸光度(不含 ABTS); ABTS 阳离子自由基清除能力用 IC_{50} 表示。

1.2.6.3 铁离子还原能力 根据文献方法并稍作调整来测定样品的铁还原能力^[21]。将 25 mL 醋酸缓冲液(300 mmol/L, pH3.6)、2.5 mL 的三吡啶基三嗪(TPTZ)-盐酸溶液(10 mmol/L TPTZ 溶于 40 mmol/L 的 HCl 中)和 2.5 mL 的 $FeCl_3$ (20 mmol/L)混合后即得 FRAP 试剂。分别制备浓度为 5、10、15、20、25 μg/mL 的芦丁水溶液和包合物水溶液, 取 100 μL 于 96 孔板中, 再加入 FRAP 试剂 100 μL, 最终体系中芦丁的浓度为 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 μg/mL, 避光反应 30 min 后, 于 593 nm 处测定溶液吸光值, 以 V_C 作为阳性对照。相同条件下以 $FeSO_4$ 为参照标准, 评价不同样品的铁离子还原能力(μmol/L $FeSO_4$), 标准曲线回归方程为 $y=0.0061x-0.0077(R^2=0.9997)$ 。

1.2.7 芦丁/HPCD 包合物的稳定性 制备含有相同芦丁浓度的芦丁水溶液和包合物水溶液, 分别置于 50 °C 烘箱中、自然光下(室温 25 °C), 研究加热和光照对包合物稳定性的影响。其中热处理实验中的样品每隔 3 d 测定芦丁浓度, 光处理实验中的样品每隔 1 d 测定芦丁浓度。

1.3 数据处理

所有实验至少进行 3 次, 实验结果用平均值±标准差(mean±SE)表示。采用 Origin 2021 作图, 使用 Duncan 多重比较和 SPSS 22 统计软件对实验结果进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 HPCD 取代度及芦丁/包合物的包封率、载药率、溶解度

如表 1 所示, 本研究所用 HPCD 的取代度为 4.3±0.01, 计算可得其相对分子质量为 1384.4±0.6, 据此可配制特定摩尔浓度的 HPCD 溶液进行包合物

的制备及相溶解度分析。包合物的包封率、载药率分别为 89.33%、26.67%, 包合物在水中的溶解度是芦丁的 51 倍, 与游离芦丁在水中的溶解度存在极显著差异($P<0.01$), 陈筠等^[22]通过溶液搅拌法制备的芦丁/羧甲基-β-环糊精包合物包埋率 62.92%, 芦丁的溶解度提高了 35 倍, 说明 HPCD 因其出色的包合能力和良好的亲水性有效改善了芦丁的溶解度, 同时也说明疏水力是芦丁与 HPCD 相互结合的重要基础。

表 1 HPCD 取代度及包合物的包封率、载药率、溶解度
Table 1 Degree of substitution of HPCD and encapsulation efficiency, drug loading rate, solubility of inclusion complex

样品	取代度	包封率(%)	载药率(%)	芦丁溶解度(mg/mL)
HPCD	4.3±0.01	—	—	—
芦丁	—	—	—	0.088±0.002
包合物	—	89.33±3.06	26.67±1.53	4.465±0.121**

注:**表示溶解度存在极显著差异($P<0.01$);—表示该项数据不存在或无实际意义。

2.2 芦丁/HPCD 包合物的相溶解度研究

相溶解度法应用于环糊精包合物的研究, 在测定包合物稳定常数的同时能推断出主客体的包合比例, 如图 1 所示, 芦丁的溶解度随 HPCD 浓度的增加而线性增加, 根据 Higuchi^[23]的报道, 其归属于 A_L 型, 说明芦丁和 HPCD 形成的是摩尔比 1:1 的包合物。经过计算, 芦丁/HPCD 包合物的稳定常数 K_s 为 418.16 L/mol, 研究报道芦丁/β-环糊精包合物的 K_s 值是 379.4 L/mol^[4], 较高的 K_s 值说明 HPCD 与芦丁的结合能力更强, 与芦丁形成的包合物更稳定, 研究表明, 稳定常数在 100~5000 L/mol 之间的包合物适合实际应用^[24], 这说明芦丁/HPCD 包合物适合投入工业中使用。芦丁/HPCD 包合物的 $\Delta G=-14.96$ kJ/mol, 吉布斯自由能 ΔG 为负值, 表明溶液中 HPCD 包合芦丁是自发的。

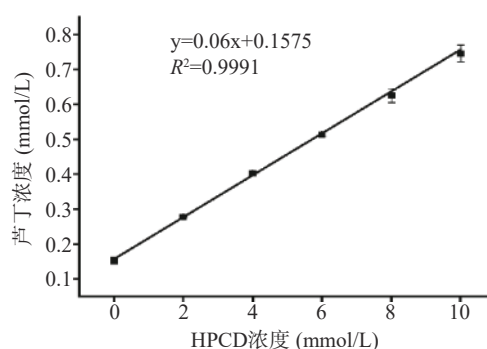


图 1 芦丁/HPCD 包合物的相溶解度曲线

Fig.1 Phase solubility curves of rutin/HPCD inclusion complex

2.3 芦丁/HPCD 包合物的表征

2.3.1 X 射线衍射分析 如图 2 所示, 在芦丁的 X 射线衍射曲线中, 在衍射角 (2θ) 10.34°、14.84°、16.68°、22.03°、26.14°等多处均有密集而尖锐的衍射峰, 表明芦丁粉末是以晶体形式存在的^[25]。HPCD 的 X 射线衍射曲线相对光滑, 在 12.29°、18.41°处有

宽的无定形衍射峰, 表明其非晶体形态^[26]。物理混合物的 X 射线衍射曲线表现出和芦丁相似的尖锐衍射峰, 说明物理混合物中芦丁和 HPCD 并未发生结合。包合物的 X 射线衍射图与 HPCD 相似, 在 13.33°、18.31° 处有宽的无定形衍射峰, 包合物中芦丁的晶体衍射峰完全消失, 说明经过包合后的芦丁不再是晶体状态^[27]。

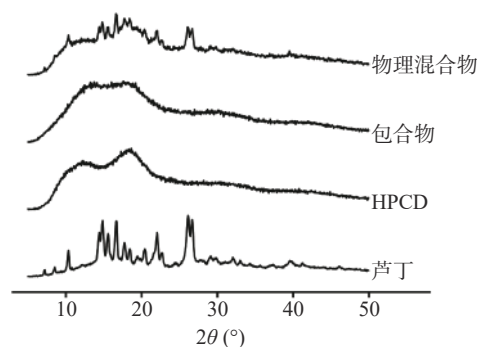


图 2 芦丁、HPCD、包合物、物理混合物的 X 射线衍射图
Fig.2 X-ray diffraction patterns of rutin, HPCD, inclusion complex, physical mixture

2.3.2 傅里叶变换红外光谱分析 如图 3 所示, 芦丁在 3332 cm^{-1} 处的峰是 -OH, 2974 cm^{-1} 和 997 cm^{-1} 处的峰是 C-H 基团, 1300~1000 cm^{-1} 处的峰是 C-O 基团^[28], 1645 cm^{-1} 处的峰是 C=O 基团, 1596 cm^{-1} 处的峰是 C=C 基团^[29]。HPCD 在 3350 cm^{-1} 处的峰是 -OH, 2928 cm^{-1} 处的峰是 C-H 基团, 1155 和 1030 cm^{-1} 属于 C-O 基团^[30]。包合物在 3340 cm^{-1} 处的峰是 -OH, 1030 cm^{-1} 处的峰对应于 HPCD 中的 C-O 基团, 1645 cm^{-1} 处的峰则对应芦丁中的 C=O 基团。包合物与物理混合物相比, 在 880 和 1235 cm^{-1} 处的吸收峰明显减弱, 说明芦丁分子与 HPCD 形成了包合物, 致使其吸收光谱受到屏蔽; 另外, HPCD 在 3350 cm^{-1} 处的 -OH 吸收峰在包合芦丁后转移到了 3340 cm^{-1} , 这可能是由于芦丁和 HPCD 形成了 O-H...O 氢键^[31]。

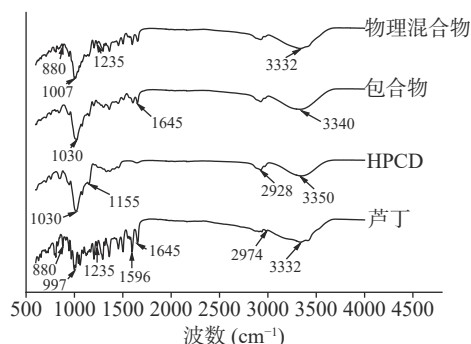


图 3 芦丁、HPCD、包合物、物理混合物的红外光谱

Fig.3 FT-IR spectra of rutin, HPCD, inclusion complex, physical mixture

2.3.3 热重分析 由图 4A 所示, 纯芦丁样品中 150 $^{\circ}\text{C}$

以下观察到的重量损失归因于水分的蒸发, 210~340 $^{\circ}\text{C}$ 的失重高峰归因于芦丁的降解^[27]。在 HPCD 样品中 95 $^{\circ}\text{C}$ 以下的重量损失是由于水分蒸发造成的, 而 300~380 $^{\circ}\text{C}$ 之间的失重高峰是由于 HPCD 的降解造成的^[30]。包合物样品中 125 $^{\circ}\text{C}$ 以下的重量损失是由于水分蒸发造成的, 250~380 $^{\circ}\text{C}$ 之间的失重高峰是由于包合物样品的降解造成的。由图 4B 可以看出, 芦丁、HPCD、包合物的最大失重速率温度分别为 266、347、318 $^{\circ}\text{C}$ 。说明芦丁被 HPCD 包合后热稳定性得到提高。这一结果与此前一些研究结果一致, 即 HPCD 或 β -环糊精可提高活性物质(如 1,8-桉叶素、丁香精油、异丁香酚)的热稳定性^[32-34]。

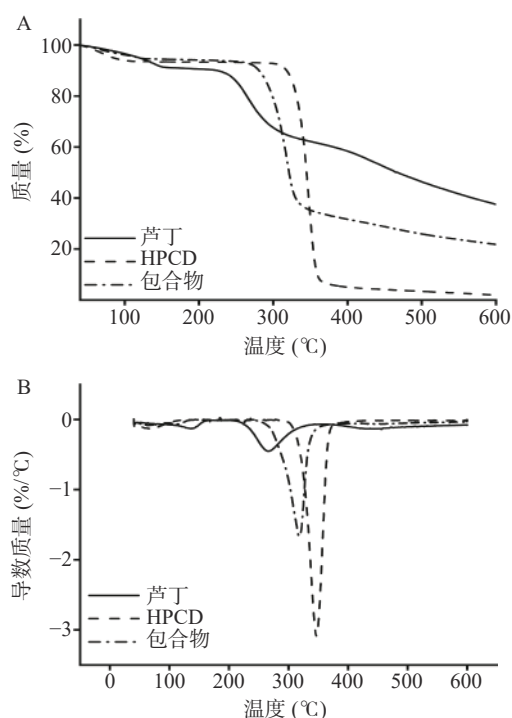


图 4 芦丁、HPCD、包合物的热重分析

Fig.4 Thermogravimetric analysis of rutin, HPCD and inclusion complex

注: (A) 为热重分析; (B) 为热重分析一阶导数图。

2.3.4 形貌分析 如图 5 所示, 芦丁在光学显微镜下表现为黄色的密集颗粒状态, HPCD 以白色的球形颗粒存在, 包合物表面呈现出和 HPCD 一样的白色, 内部则呈现出和芦丁一样的黄色, 说明芦丁和 HPCD 成功形成了包合物。

通过 SEM 可以进一步分析样品的形貌特征, 如图 6 所示, 芦丁的 SEM 图像呈现出不规则、零碎的结构^[35]。HPCD 的 SEM 图像为多孔的球形空腔结构^[36]。包合物呈现出不规则的片状结构, 与两种纯化化合物的形貌完全不同, 这种变化是一种新的固相存在的证据^[37], 本研究与之前报道的一些研究结果一致, 反式虎杖甙^[38]、大豆苷元^[39]、美洛昔康^[40]与 HPCD 形成包合物后, 包合物的 SEM 图像呈现出与两种原始组分完全不同的片状结构, 表明 HPCD 成功包合了芦丁。



图5 芦丁(a)、HPCD(b)、包合物(c)的光学显微镜图像(400×)

Fig.5 Optical microscope images of rutin (a), HPCD (b), inclusion complex (c) (400×)



图6 芦丁(a)、HPCD(b)、包合物(c)的扫描电镜图

Fig.6 Scanning electron microscope images of rutin (a), HPCD (b), inclusion complex (c)

2.4 芦丁/HPCD 包合物的抗氧化能力

如图7所示,随着样品浓度增加,三种样品对DPPH自由基和ABTS阳离子自由基的清除率也随之增加,对两种自由基的清除能力依次为 V_C >包合物>芦丁。如表2所示,芦丁清除DPPH自由基和 $ABTS^+$ 自由基的 IC_{50} 分别为4.50、6.25 $\mu\text{g/mL}$,包合物的 IC_{50} 分别为2.80、4.04 $\mu\text{g/mL}$, V_C 清除DPPH自由基和 $ABTS^+$ 自由基的能力较强,其 IC_{50} 分别为2.01、2.95 $\mu\text{g/mL}$,包合物清除两种自由基的 IC_{50} 均显著低于芦丁($P<0.05$),这与此前的研究一致,光甘草定^[41]、橙皮苷和橙皮素^[42]与HPCD形成包合物后均表现出更高的DPPH自由基清除能力,叔丁基对苯二酚^[43]与HPCD形成包合物后表现出更高的 $ABTS^+$ 自由基清除能力。抗氧化剂清除DPPH自由基和 $ABTS^+$ 自由基的能力与其供氢能力密切相关,芦丁与HPCD之间形成包合物后削弱了芦丁的分子内氢键,提高了芦丁的供氢能力,使得包合物显示出比芦丁更高的自由基清除能力^[38]。

如图7所示,随着样品浓度增加,三种样品的铁离子还原能力均随之增加,铁离子还原能力依次为 V_C >包合物>芦丁。如表2所示,在相同的芦丁浓度下(12.5 $\mu\text{g/mL}$),包合物的铁离子还原能力是芦丁的1.2倍,显著高于芦丁($P<0.05$),这与此前的研究一致,迷迭香酸^[44]、橙皮素^[45]与HPCD形成包合物后均表现出更高的铁离子还原能力。研究表明,在水体系中进行实验时,对于疏水性强的化合物,其铁离子还原能力往往较弱^[46],因此芦丁和HPCD形成包合物后可能是由于芦丁的水溶性得到提高,使得包合物显示出比芦丁更高的铁离子还原能力。

2.5 芦丁/HPCD 包合物的稳定性

如图8所示,在自然光和热的作用下,随着时间

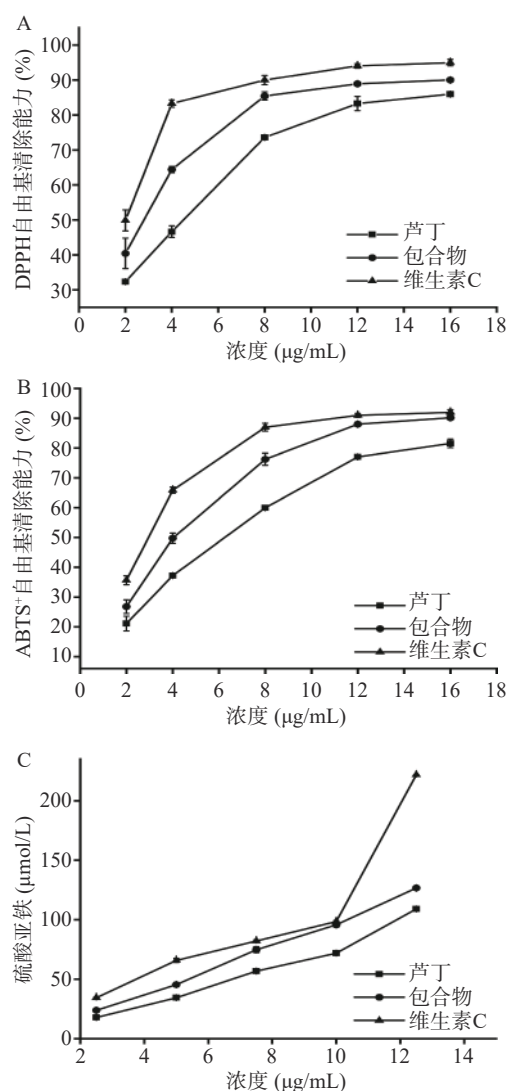


图7 芦丁、包合物、维生素C的抗氧化能力

Fig.7 Antioxidant capacity of rutin, inclusion complex and vitamin C

表 2 芦丁、包合物、维生素 C(V_C)抗氧化能力显著性分析
Table 2 Significance analysis of antioxidant capacity of rutin, inclusion complex, vitamin C (V_C)

样品	DPPH自由基 IC ₅₀ (μg/mL)	ABTS ⁺ 自由基 IC ₅₀ (μg/mL)	铁离子还原能力(μmol/L) (12.5 μg/mL样品对应 FeSO ₄)
V _C	2.01±0.21 ^a	2.95±0.19 ^a	218.30±0.16 ^c
包合物	2.80±0.11 ^b	4.04±0.13 ^b	123.22±0.40 ^b
芦丁	4.50±0.05 ^c	6.25±0.06 ^c	105.56±0.16 ^a

注: 同列不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)。

推移, 游离和包合芦丁都逐渐降解, 游离芦丁的损失比例明显高于包合芦丁, 自然光下暴露 6 d 后, 游离和包合芦丁的保留率分别为 31.80%、66.70%; 50 ℃ 暴露 15 d 后, 游离和包合芦丁的保留率分别为 66.91%、87.38%。独立样本 T 检验结果表明, 自然光下暴露 1 d 或者 50 ℃ 热处理 6 d 后, 游离态和包合芦丁的保留率出现极显著差异($P<0.01$), 此前的研究发现, 八角茴香醇提取物^[47]、β-酸^[48]被 HPCD 包合后热稳定性和光照稳定性提升, 说明 HPCD 可以有效提高芦丁的光、热稳定性。

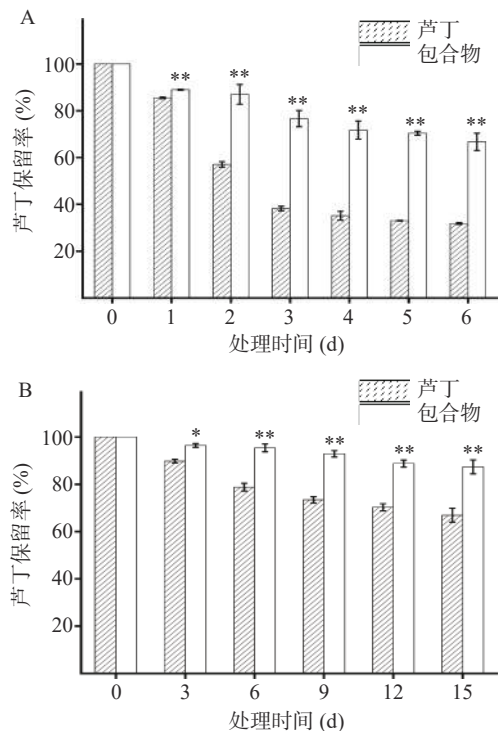


图 8 光照(A)和加热(B)对芦丁、包合物稳定性的影响
Fig.8 Effects of light (A) and heating (B) on the stability of rutin, inclusion complex
注: *代表同一时间取样游离和包合芦丁保留率差异显著($P<0.05$); **代表差异极显著($P<0.01$)。

3 结论

本研究通过溶剂蒸发法成功制备了芦丁/HPCD 包合物, 包合物中二者摩尔比为 1:1, 其包封率和载药率分别为 89.33%、26.67%, 包合物在水中的溶解度是游离芦丁的 51 倍。运用光学和热分析仪器对包合物进行表征, 结果发现芦丁被 HPCD 包合后晶

体衍射峰完全消失, 芦丁热稳定性增强, 芦丁与 HPCD 形成了氢键以及疏水相互作用, 固体包合物呈现不规则片状结构, 包合物的形成使芦丁的抗氧化、抗光、抗热能力显著提升($P<0.05$)。本研究用 HPCD 包合芦丁, 极大改善了芦丁由于溶解度差导致的应用限制, 这为芦丁在食品、药品、化妆品等行业的应用提供了有价值的理论指导。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

[1] CHATTOPADHYAY D, THIRUMURUGAN K. Longevity-promoting efficacies of rutin in high fat diet fed *Drosophila melanogaster*[J]. *Biogerontology*, 2020, 21(5): 653–668.
[2] 杨诗宇, 宋基正, 杨山景, 等. 芦丁药理作用与新剂型的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(10): 1360–1370. [YANG S Y, SONG J Z, YANG S J, et al. Research progress on pharmacological action and new dosage forms of rutin[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2022, 39(10): 1360–1370.]
[3] CHOI S S, PARK H R, LEE K A. A comparative study of rutin and rutin glycoside: Antioxidant activity, anti-inflammatory effect, effect on platelet aggregation and blood coagulation[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(11): 1696.
[4] LIU J, ZHANG S, ZHAO X, et al. Molecular simulation and experimental study on the inclusion of rutin with beta-cyclodextrin and its derivative[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2022, 1254: 132359.
[5] CHANG C K, SONG M, MA M X, et al. Preparation, characterization and molecular dynamics simulation of rutin-cyclodextrin inclusion complexes[J]. *Molecules*, 2023, 28(3): 955.
[6] CARNEIRO S B, DUARTE F I C, HEIMFARTH L, et al. Cyclodextrin-drug inclusion complexes: *In vivo* and *in vitro* approaches[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(3): 642.
[7] OZTUERK A A, BASARAN E, SENEL B, et al. Synthesis, characterization, antioxidant activity of quercetin, rutin and quercetin-rutin incorporated beta-cyclodextrin inclusion complexes and determination of their activity in NIH-3T3, MDA-MB-231 and A549 cell lines[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2023, 1282: 135169.
[8] 袁超. 羟丙基-β-环糊精的制备、性质及应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008. [YUAN C. Preparation, properties and application of hydroxypropyl-β-cyclodextrins[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008.]
[9] JOHNSON D P. Spectrophotometric determination of the hydroxypropyl group in starch ethers[J]. *Analytical Chemistry*, 1969, 41(6): 859–860.
[10] 李燕红. 羟丙基-β-环糊精的制备及其与烯丙酯的包合研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013. [LI Y H. Preparation of hydroxypropyl-β-cyclodextrin and study on its inclusion complex with allylethrin[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013.]
[11] BASARAN E, OZTURK A A, SENEL B, et al. Quercetin, rutin and quercetin-rutin incorporated hydroxypropyl beta-cyclodextrin inclusion complexes[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2022, 172: 106153.
[12] 范杰平. 柿叶中有效成分的提取与分离研究[D]. 杭州: 浙

- 江大学, 2006. [FAN J P. Study on the extraction and separation of the active components in the leaves of *Diospyros kaki* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006.]
- [13] 张静. 银杏黄酮纯化及生物活性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2010. [ZHANG J. Study on purification and bioactivity of ginkgo flavonoid [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010.]
- [14] GAN L, ZHANG C, WU F J, et al. Microencapsulated nanostructured lipid carriers as delivery system for rutin[J]. *Materials Technology*, 2018, 33(5): 357–363.
- [15] PORWAL O. Box-behnken design-based formulation optimization and characterization of spray dried rutin loaded nanosuspension: State of the art[J]. *South African Journal of Botany*, 2022, 149: 807–815.
- [16] 陈筠. 芸香苷的包埋改性及其应用研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2017. [CHEN J. Study on embedding modification of rutin and its application [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2017.]
- [17] PHAM T L, USACHEVA T R, KUZ'MINA I A, et al. Effect of cyclodextrin types and reagents solvation on the stability of complexes between β -cyclodextrins and rutin in water-ethanol solvents [J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2020, 318: 114308.
- [18] RAKMAI J, CHEIRSILP B, MEJUTO J C, et al. Physicochemical characterization and evaluation of bio-efficacies of black pepper essential oil encapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin [J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 65: 157–164.
- [19] 邹亚男. 番石榴叶发酵增效及其提取物包合与体外消化 [D]. 广州: 华南理工大学, 2019. [WU Y N. Preparation inclusion compound of fermentation *Psidium guajava* L extract and *in vitro* digestion simulation [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.]
- [20] SASIPRIYA G, SIDDHURAJU P. Effect of different processing methods on antioxidant activity of underutilized legumes, *Entada scandens* seed kernel and *Canavalia gladiata* seeds [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50(8): 2864–2872.
- [21] 周晓婷. 苦荞醇溶粗提物对淀粉酶的影响及体内抗氧化性研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2017. [ZHOU X T. Effect of tartary buckwheat extract on amylase and antioxidant property *in vivo* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.]
- [22] 陈筠, 许诗豪, 罗井清, 等. 芸香苷-羧甲基- β -环糊精包合物的制备及其表征 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38(21): 197–202. [CHEN J, XU S H, LUO J Q, et al. Preparation and characterization of the rutin-CM- β -CD inclusion complex [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(21): 197–202.]
- [23] HIGUCHI T. Phase-solubility techniques [J]. *Analysis Chemistry Instrument*, 1965, 4: 117–212.
- [24] MARQUES H M C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles [J]. *Flavour and Fragrance Journal*, 2010, 25(5): 313–326.
- [25] RAVI G S, CHARYULU R N, DUBEY A, et al. Nano-lipid complex of rutin: Development, characterisation and *in vivo* investigation of hepatoprotective, antioxidant activity and bioavailability study in rats [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2018, 19(8): 3631–3649.
- [26] AL-QUBAISI M S, RASEDEE A, FLAIFEL M H, et al. Characterization of thymoquinone/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex; Application to anti-allergy properties [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 133: 167–182.
- [27] NAEEM A, YU C Q, ZANG Z Z, et al. Synthesis and evaluation of rutin-hydroxypropyl beta-cyclodextrin inclusion complexes embedded in xanthan gum-based (HPMC-g-AMPS) hydrogels for oral controlled drug delivery [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(3): 552.
- [28] NETO C M S, LIMA F C, MORAIS R P, et al. Rutin-functionalized multi-walled carbon nanotubes: Molecular docking, physicochemistry and cytotoxicity in fibroblasts [J]. *Toxics*, 2021, 9(8): 173.
- [29] GERA S, POOLADANDA V, GODUGU C, et al. Rutin nanosuspension for potential management of osteoporosis: Effect of particle size reduction on oral bioavailability, *in vitro* and *in vivo* activity [J]. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2020, 25(8): 971–988.
- [30] SUN C, CAO J P, WANG Y, et al. Ultrasound-mediated molecular self-assemble of thymol with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin for fruit preservation [J]. *Food Chemistry*, 2021, 363: 130327.
- [31] JIANG L W, YANG J D, WANG Q, et al. Physicochemical properties of catechin/beta-cyclodextrin inclusion complex obtained via co-precipitation [J]. *Cyta-Journal of Food*, 2019, 17(1): 544–551.
- [32] BABAOGLU H C, BAYRAK A, OZDEMIR N, et al. Encapsulation of clove essential oil in hydroxypropyl beta-cyclodextrin for characterization, controlled release, and antioxidant activity [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2017, 41(5): 13202.
- [33] SIVA S, LI C Z, CUI H Y, et al. Encompassment of isoeugenol in 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin using ultrasonication: Characterization, antioxidant and antibacterial activities [J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2019, 296: 111777.
- [34] YIN H, WANG C X, YUE J, et al. Optimization and characterization of 1,8-cineole/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex and study of its release kinetics [J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 110: 106159.
- [35] YUSUF H, SAVITRI O M N, PRIMA HARINASTITI R, et al. A lyophilized surfactant-based rutin formulation with improved physical characteristics and dissolution for oral delivery [J]. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2023, 31(6): 1077–1083.
- [36] GAO S, BIE C, LIU Y Y, et al. Functional supramolecular of inclusion complex of herbicide fluroxypyr with HP β CD [J]. *Polymers*, 2018, 10(12): 1294.
- [37] VENUTI V, CRUPI V, FAZIO B, et al. Physicochemical characterization and antioxidant activity evaluation of idebenone/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(10): 531.
- [38] LI S, YUAN L, ZHANG B, et al. Photostability and antioxidant activity studies on the inclusion complexes of trans-polydatin with β -cyclodextrin and derivatives [J]. *RSC Advances*, 2018, 8(46): 25941–25948.
- [39] LI S, YUAN L, CHEN Y, et al. Studies on the inclusion complexes of daidzein with β -cyclodextrin and derivatives [J]. *Molecules*, 2017, 22(12): 2183.
- [40] LEI X M, ZHANG G S, YANG T, et al. Preparation and *in vitro* and *in vivo* evaluation of rectal In situ gel of meloxicam hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex [J]. *Molecules*, 2023, 28(10): 4099.
- [41] WEI Y, ZHANG J, ZHOU Y, et al. Characterization of glabridin/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex with robust solubility and enhanced bioactivity [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 159: 152–160.
- [42] WDOWIAK K, ROSIAK N, TYKARSKA E, et al. Amorphous inclusion complexes: Molecular interactions of hesperidin and hesperetin with HP- β -CD and their biological effects [J]. *Internat-*

tional Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(7): 4000.

[43] PU H, SUN Q, TANG P, et al. Characterization and antioxidant activity of the complexes of tertiary butylhydroquinone with beta-cyclodextrin and its derivatives[J]. Food Chemistry, 2018, 260: 183–192.

[44] STASILOWICZ-KRZEMIEN A, ROSIAK N, PLAZINSKA A, et al. Cyclodextrin derivatives as promising solubilizers to enhance the biological activity of rosmarinic acid[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(10): 2098.

[45] SYKUŁA A, BODZIOCH A, NOWAK A, et al. Encapsulation and biological activity of hesperetin derivatives with HP- β -CD[J]. Molecules, 2023, 28(19): 6893.

[46] LUE B M, NIELSEN N S, JACOBSEN C, et al. Antioxidant properties of modified rutin esters by DPPH, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein assays[J]. Food Chemistry, 2010, 123(2): 221–230.

[47] GUAN T, ZHANG G, SUN Y, et al. Preparation, characterization, and evaluation of HP-beta-CD inclusion complex with alcohol extractives from star anise[J]. Food & Function, 2021, 12(20): 10008–10022.

[48] GU W J, LIU Y M. Characterization and stability of beta-acids/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex[J]. Journal of Molecular Structure, 2020, 1201: 127159.