

芹菜素 γ -环糊精包合物的表征和抗氧化活性研究

李进霞, 王 佳, 康明丽, 杨靖辉, 闫燕艳, 张慧芝, 谷 艳*

山西大同大学 医学院, 山西 大同 037009

摘 要: **目的** 研究芹菜素与 γ -环糊精 (γ -CD) 包合物的制备、表征、包合机制及其抗氧化活性。**方法** 采用加热回流共沉淀法制备芹菜素 γ -环糊精包合物, 红外光谱法 (IR) 对形成的包合物进行表征, 荧光光谱法测定包合物的包合常数 (K) 和包合比 (n); 荧光光谱法和核磁共振法 (NMR) 研究芹菜素与 γ -CD 在溶液中形成的包合物; 双倒数曲线法研究包合前后对自由基 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH·) 的清除率。**结果** 在不同的 pH 值溶液中, γ -CD 对芹菜素具有不同的包合能力, γ -CD 最适合在中性介质中与芹菜素形成包合物, 在实验浓度范围内按 1:1 形成包合物, 包合比为 1:236, 包合物对自由基 DPPH· 的清除活性更强; NMR 确定包合物的结构。**结论** 在实验条件下, 芹菜素分子从 γ -CD 大口端进入到空腔内形成稳定的包合物, 且抗氧化活性增加。

关键词: 芹菜素 γ -环糊精包合物; 芹菜素; γ -环糊精; 红外光谱; 荧光光谱法; 核磁共振; 清除率

中图分类号: R944 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2020)04-0647-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.04.009

Characterization and antioxidant activity of apigenin γ -cyclodextrin inclusion complex

LI Jin-xia, WANG Jia, KANG Ming-li, YANG Jin-hui, YAN Yan-yan, ZHANG Hui-zhi, GU Yan

School of Medicine, Shanxi Datong University, Datong 037009, China

Abstract: **Objective** To study the preparation, structure, inclusion mechanism and antioxidant activity of apigenin γ -cyclodextrin (γ -CD) inclusion complex. **Methods** Apigenin γ -cyclodextrin inclusion complex was prepared by heating reflux coprecipitation method. The inclusion complex was characterized by infrared spectroscopy (IR). The inclusion constant (K) and inclusion ratio (n) of the inclusion complex were determined. The inclusion complex of apigenin and γ -CD in solution was studied by fluorescence spectroscopy and nuclear magnetic resonance (NMR). The scavenging rate of 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH·) before and after inclusion was studied by double reciprocal curve method. **Results** In different pH solutions, γ -CD has different inclusion ability to apigenin. γ -CD was most suitable to form inclusion complex with apigenin in neutral medium. In the range of experimental concentration, apigenin and γ -CD form inclusion complex was at 1:1, the inclusion ratio was 1:236, and apigenin/ γ -CD inclusion complex was more stronger in scavenges free radical DPPH· than free apigenin. The structure of the inclusion complex was confirmed by NMR. **Conclusion** Under the experimental conditions, apigenin molecule is encapsulated into the cavity from the large mouth of γ -CD, forming a stable inclusion complex, and the antioxidant activity is increased.

Key words: apigenin γ -cyclodextrin inclusion complex; apigenin; γ -cyclodextrin; IR; fluorescence; NMR; scavenging rate

芹菜素是中药中有效活性成分之一, 具有多种活性, 如抗菌、抗毒, 抗 HIV 活性, 减轻氧化应激, 抑制多种类型细胞的生长, 对多种细胞的损伤具有保护作用等活性^[1-4]。芹菜素为黄酮类化合物, 水溶性低, 且分子中含有多个酚羟基, 易被氧化而不稳定, 在医药领域的应用受到限制。为了增加芹菜素

的极性和稳定性, 从而增加芹菜素临床应用的生物利用度和临床药效, 临床需要一种包合材料与其作用, 从而改善芹菜素自身的理化性质, 对提高芹菜素的药效有着非常重要的意义。超分子化学一直备受广泛关注^[5-7]。药物分子与环糊精分子的包合过程通常会对客体分子的理化性质和药物性质产生调节

收稿日期: 2020-02-17

基金项目: 山西省应用基础研究青年研究计划项目 (201901D211429); 大同市应用基础研究计划项目 (2019170)

作者简介: 李进霞 (1979—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为中药有效成分的包合。E-mail: 13935238620@163.com

*通信作者 谷 艳 (1981—), 女, 副教授, 博士研究生。E-mail: 946981641@qq.com

作用,如能够增加药物的溶解度、提高化学稳定性和生物利用度、降低毒性、控制释放速率等^[8-13]。芹菜素与 β -环糊精(β -CD)和羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)的包合作用已有研究^[14]。 γ -环糊精(γ -CD)是环糊精的水溶性衍生物,其内腔更大,同样被广泛用作许多药物的包合剂^[15]。通过芹菜素与 γ -CD包合物的研究,不仅可以增加芹菜素本身的溶解度,改善芹菜素临床应用的生物利用度和效应,还可以通过包合作用增加芹菜素药物本身的稳定性,便于临床贮存与使用,因而本研究研究了芹菜素与 γ -CD包合物的制备、表征、包合机制及其抗氧化活性。

1 材料

UV-757CRT 分光光度计(上海精密仪器有限公司);F-2500 FL 荧光分光光度计(日本岛津公司),1 cm 石英池,两个狭缝均为2 nm,激发波长270 nm。300 MHz 核磁共振波谱仪(Bruker Avance DRX)。FT-1730 红外光谱仪(Perkin Elmer),KBr 造粒,光谱范围为400~4 000 cm^{-1} 。

芹菜素由山西中医药大学提供,质量分数 $\geq 99\%$ 。 γ -CD 和 DPPH 均购自 Sigma-Aldrich 公司。所有其他试剂均为分析纯试剂,使用时未经纯化。整个过程使用双重蒸馏水。用0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液控制溶液的pH 值。所有实验均在室温(20 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 芹菜素储备液的制备 精密称取2.7 mg 芹菜素于100 mL 量瓶中,经超声法制成浓度为0.1 mmol/L 的储备液。

2.1.2 γ -CD 溶液的制备 精密称取1.290 g γ -CD 于100 mL 量瓶中,制成10 mmol/L γ -CD 溶液。

2.2 包合物的制备

采用加热回流共沉淀法制备芹菜素 γ -环糊精包合物。将约2.7 mg 芹菜素放入50 mL 烧杯,加入10 mL 蒸馏水,置于电磁搅拌器上搅拌至溶解。同时准确称取13 mg γ -CD 放入50 mL 锥形瓶中,加入10 mL 蒸馏水,搅拌溶解,缓慢将 γ -CD 溶液加入进芹菜素溶液中。最终将混合溶液装入加热回流装置中,在室温条件下连续搅拌6 h,将反应混合物冷却过夜,用G4 砂滤漏斗滤过沉淀,用蒸馏水不断洗涤,在60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥,得白色粉末状固体。

2.3 红外光谱研究

参考文献报道^[14,16-18],取芹菜素、 γ -CD 和芹菜素 γ -CD 包合物进行红外光谱测定,见图1。可以看出,芹菜素分子中C-O 基团、苯环的吸收强度发生了明显变化,包合物分子中C-O 基团、苯环的吸收强度弱于游离芹菜素,且发生了一定的位移,可以推导出芹菜素分子中的C-O 基团、苯环被包含在 γ -CD 的空腔中。

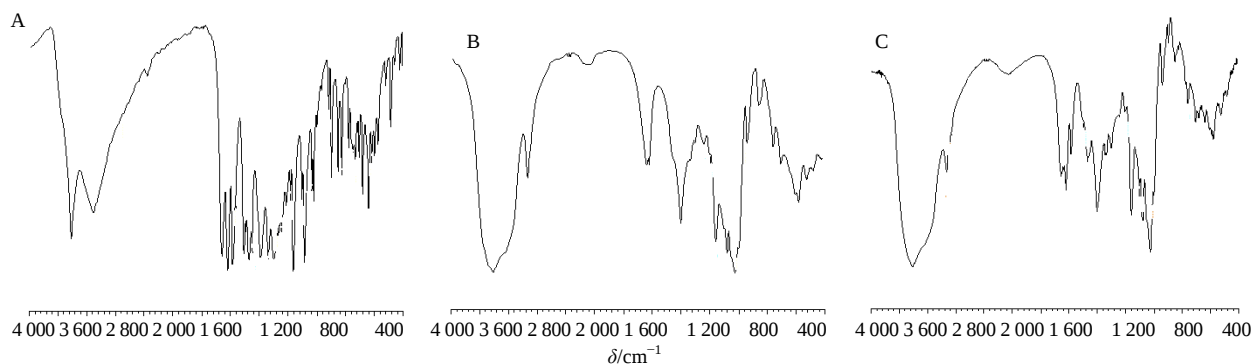


图1 芹菜素(A)、 γ -CD(B)和芹菜素 γ -CD包合物(C)的红外光谱

Fig. 1 IR spectra of apigenin (A), γ -CD (B), and apigenin/ γ -CD inclusion complex (C)

2.4 荧光光谱测定

参考文献报道^[14,16-18],移取1 mL 芹菜素储备液到10 mL 比色管中,加入适量的10 mmol/L γ -CD 溶液,0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液2 mL 用于调节溶液的pH 值,用蒸馏水将溶液稀释至10 mL,混合液

在超声波作用下溶解30 min,随后在(20 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 的室温条件下平衡30 min,最终将溶液转移到1 cm $\times$ 1 cm 的石英池中进行荧光光谱的测定,同时做空白对照。室温条件下,芹菜素 γ -CD 包合物的荧光光谱见图2。在芹菜素溶液中加入 γ -CD 可使荧光

信号显著增强。激发波长为 270 nm, 最大发射波长为 326、335 nm。随着 γ -CD 的增加, 发射波长向低波长漂移, 这表明芹菜素与 γ -CD 之间形成了包合物。 γ -CD 内腔为芹菜素分子提供了一个疏水环境, 芹菜素分子在腔中的运动受到很大的限制, 稳定性增加, 其刚性增强导致了荧光量子产率增加。

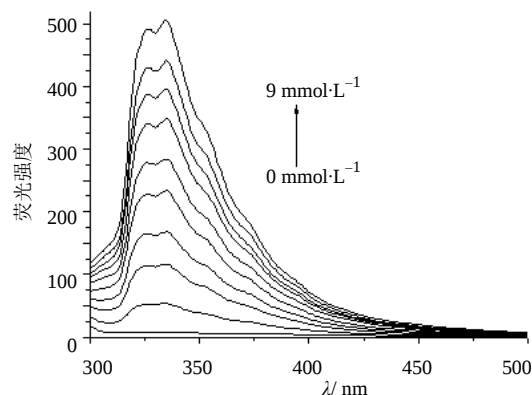


图 2 芹菜素与 γ -CD 在溶液中形成包合物的荧光光谱 (γ -CD 浓度为 0~9 mmol/L)

Fig. 2 Fluorescence emission spectra of apigenin in γ -CD solution (concentration of γ -CD: 0 — 9.0 mmol/L)

2.5 包合常数测定

包合常数 (K) 通过修正的 Benesi-Hildebrand 方程^[19-20]计算得到。

$$1/(F-F_0) = 1/([CD]K\alpha) + 1/\alpha$$

其中 K 为包合常数, α 为反应常数, F 表示不同浓度的 γ -CD 溶液中芹菜素的荧光强度, F_0 为不加 γ -CD 溶液时芹菜素的荧光强度

以 $1/[CD]$ 为横坐标, $1/(F-F_0)$ 为纵坐标作图, 计算出不同 pH 值 (pH 3.00、5.00、6.50、9.00) 条件下各包合常数的值, 见表 1。包合常数的线性关系良好, 说明芹菜素与 γ -CD 是按 1:1 形成包合物。还可以看出, γ -CD 在不同 pH 值的溶液中具有不同的包合能力, 而在中性介质中最适合与芹菜素形成包合物。

表 1 芹菜素与 γ -CD 在不同 pH 值条件下的包合常数

Table 1 Constants of inclusion complex between apigenin with γ -CD

pH 值	K	R^2
3.00	530	0.998 2
5.00	747	0.999 1
6.50	1 236	0.998 7
9.00	508	0.999 5

2.6 核磁共振谱测定

参考文献报道^[14,16-18], 将体积比为 1:1 的 0.1 mmol/L 芹菜素溶液与 0.1 mmol/L γ -CD 溶液充分混合。以重水为溶剂, 在 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的室温条件下, 300.13 MHz, 90°脉冲下获得核磁共振氢谱, 芹菜素与 γ -CD 在形成包合物前后的 ^1H -NMR 谱见图 3。芹菜素在形成包合物前后分子中氢化学位移值的变化见表 2。形成包合物前后 γ -CD 的氢化学位移的变化值见表 3。

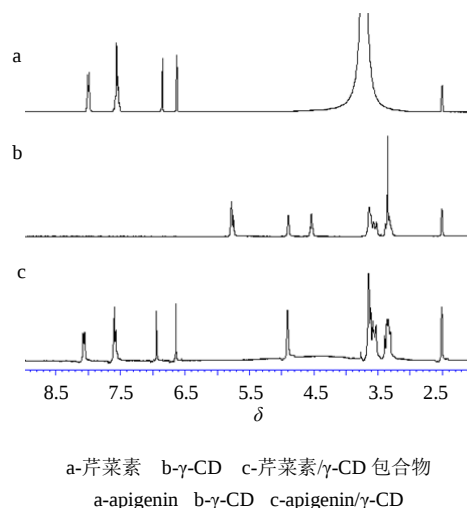


图 3 芹菜素与 γ -CD 在 D_2O 中相互作用的 ^1H -NMR

Fig. 3 ^1H -NMR spectra of inclusion complexes

表 2 芹菜素与 γ -CD 在 D_2O 中相互作用前后 ^1H -NMR 的化学位移值

Table 2 ^1H -NMR chemical shifts of apigenin and apigenin / γ -CD in D_2O

芹菜素 (H)	芹菜素 (δ_0)	芹菜素/ γ -CD (δ_1)	$\Delta\delta_1$
H-8	6.627	6.641	0.014
H-3	6.847	6.939	0.092
H-6	6.313	6.311	0.002
H-3'5'	7.560	7.598	0.038
H-2'6'	8.012	8.080	0.068

表 3 γ -CD 在 D_2O 中形成包合物前后 ^1H -NMR 化学位移值

Table 3 ^1H -NMR chemical shifts of γ -CD and the inclusion complex in D_2O

γ -CD (H)	γ -CD (δ_0)	芹菜素/ γ -CD (δ_1)	$\Delta\delta_1$
H-4	3.376	3.312	0.064
H-2	3.413	3.374	0.039
H-5	3.633	3.571	0.062
H-6	3.633	3.625	0.008
H-3	3.728	3.653	0.075

可以看出, 芹菜素分子中的 H-8、H-3、H-3、H-5、H-2、H-6 的化学位移发生了较大变化, 说明芹菜素分子的 A、B、C 环均进入 γ -CD 的空腔内, 这是由于芹菜素分子进入到 γ -CD 内腔使其分子旋转自由度减小所致。同时 γ -CD 分子的 H-3 比 H-5 发生了较大的化学位移, 说明芹菜素分子是从 γ -CD 分子的大孔端进入空腔的。

2.7 清除自由基 DPPH 研究

参考文献报道^[14,16-18], 通过测定芹菜素与 γ -CD 形成包合物前后对稳定自由基 DPPH 的清除率大小来判定其抗氧化活性能力。其中 DPPH 在 517~520 nm 处有紫外吸收, 但在抗氧化剂存在下, 或自由基被还原后, 其吸收率将降低。而 DPPH 在水中溶解度小, 易溶于乙醇中, 经筛选研究, 最终选择乙醇、水的比值为 20:80 作为溶剂, 配制成 10 μ mol/L 的 DPPH 溶液。

取 2 mL DPPH 溶液于比色管中, 分别加入 10 μ mol/L 芹菜素溶液 1 mL 和芹菜素/ γ -CD 溶液, 充分反应, 测定吸收波长为 520 nm。空白溶液为 10 μ mol/L DPPH·2 mL, 加入 1 mL 乙醇水 (20:80)。结果用 DPPH 的相对清除量计算^[21]。

$$AU = (1 - A_s/A_0) \times 100$$

其中 AU 为自由基清除活性, A_s 、 A_0 分别为样品溶液、空白溶液的紫外吸光度值

DPPH 是一种稳定的自由基, 在有机溶剂中可形成深紫色溶液。当芹菜素作为抗氧化剂存在时, 其溶液颜色会逐渐变浅。通过监测 520 nm 处 DPPH 的吸光度值的下降值来测量 DPPH 清除反应的速率。

结果芹菜素 γ -CD 包合物的自由基清除率为 56.67%, 大于游离芹菜素的自由基清除率 33.33%。其原因可能是由于酚类、黄酮类化合物的抗氧化活性一方面取决于分子结构中羟基化的位置和程度, 另一方面取决于环结构的自由化性质。通过形成分子内氢键以及第 2 个羟基的存在都会增强其抗氧化活性^[22]。因而芹菜素与 γ -CD 形成包合物后, 一方面包合物中芹菜素分子的自由活动降低, 刚性增强, 另一方面包合物中芹菜素分子中羟基的位置与 γ -CD 的羟基基团足够接近, 形成分子内氢键, 从而使其抗氧化活性增加^[23]。

3 讨论

本研究通过荧光光谱、红外光谱和核磁共振波谱等手段研究了芹菜素与 γ -CD 的包合作用。影响

分子识别的主要因素是 γ -CD 分子与药物分子的大小匹配以及药物分子的疏水性。芹菜素 γ -CD 包合物清除自由基 DPPH 的活性强于游离芹菜素, γ -CD 最适合在中性介质中与芹菜素形成包合物, 在研究的浓度范围内, 芹菜素与 γ -CD 是按 1:1 形成了稳定的包合物, 同时通过 NMR 解释了包合物形成的机制。可能因为 γ -CD 内腔为芹菜素分子提供了一个疏水环境, 芹菜素分子在腔中的运动受到很大的限制, 即其刚性增强, 荧光量子产率增加, 增加了分子的稳定性, 避免了分子与分子之间的靠近。因而形成的包合物不仅可以增加药物分子的稳定性, 还可以增加溶解度, 这在临床应用过程中可以大大提高药物的生物利用度和效应, 有望为临床拓宽给药途径、制剂形式提供依据。

参考文献

- [1] Funakoshi-Tago M, Nakamura K, Tago K, et al. Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, apigenin, luteolin and fisetin [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(9): 1150-1159.
- [2] Tong X, Van Dross R T, Abu-Yousif A, et al. Apigenin prevents UVB-induced cyclooxygenase 2 expression: coupled mRNA stabilization and translational inhibition [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(1): 283-296.
- [3] Gates M A, Vitonis A F, Tworoger S S, et al. Flavonoid intake and ovarian cancer risk in a population-based case-control study [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(8): 1918-1925.
- [4] Okla M, Al Madani J O, Chung S, et al. Apigenin reverses interleukin-1 β -induced suppression of adipocyte browning via COX2/PGE2 signaling pathway in human adipocytes [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2020, 64(1): e1900925.
- [5] Kale S, Goncarenco A, Markov Y, et al. Molecular recognition of nucleosomes by binding partners [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2019, 56: 164-170.
- [6] Alvarez-Malmagro J, Su Z, Leitch J J, et al. Electric-field-driven molecular recognition reactions of guanine with 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-cytidine monolayers deposited on gold electrodes [J]. *Langmuir*, 2019, 35(28): 9297-9307.
- [7] Ndendjio S A Z, Isaacs L. Molecular recognition properties of acyclic cucurbiturils toward amino acids, peptides, and a protein [J]. *Supramol Chem*, 2019, 31(7): 432-441.
- [8] Ono N, Arima H, Hirayama F, et al. A moderate interaction of maltosyl- α -cyclodextrin with Caco-2 cells in comparison with the parent cyclodextrin [J]. *Biol*

- Pharm Bull*, 2001, 24(4): 395-402.
- [9] 彭小丽, 白小红, 原红霞. 竞争光度法研究 β -环糊精及其衍生物对左氧氟沙星和氧氟沙星的识别和含量测定 [J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(7): 587-590.
- [10] Canbolat M F, Celebioglu A, Uyar T, *et al*. Drug delivery system based on cyclodextrin-naproxen inclusion complex incorporated in electrospun polycaprolactone nanofibers [J]. *Colloids Surf B Biointerf*, 2014, 115(1): 15-21.
- [11] Gao J, Guo Z, Su F, *et al*. Ultrasensitive electrochemical immunoassay for CEA through host-guest interaction of β -cyclodextrin functionalized graphene and Cu@Ag core-shell nanoparticles with adamantane-modified antibody [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 63: 465-471.
- [12] Masood F, Yasin T, Bukhari H, *et al*. Characterization and application of roxithromycin loaded cyclodextrin based nanoparticles for treatment of multidrug resistant bacteria [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 61: 1-7.
- [13] Barbosa P F P, Cumba L R, Andrade, Rômulo Davi Albuquerque, *et al*. Chemical modifications of cyclodextrin and chitosan for biological and environmental applications: metals and organic pollutants adsorption and removal [J]. *J Polym Environ*, 2019, 27(6): 1352-1366.
- [14] 李进霞, 于肯明, 张慧芝, 等. 芹菜素-环糊精包合物在溶液中的制备、表征及抗氧化性 [J]. 山西大同大学学报: 自然科学版, 2015, 31(6): 40-43.
- [15] 吴碧媛, 周奕先, 潘 昕, 等. γ -环糊精金属有机骨架材料提高难溶性药物二氟尼柳的溶出速率 [J]. 药学报, 2019, 54(1): 29-35.
- [16] 李进霞. 黄芩有效活性成分与环糊精超分子体系的作用研究 [D]. 太原: 山西大学, 2009.
- [17] 李进霞. 诺氟沙星与 Me- β -CD 的包合能力的研究 [J]. 实用医技杂志, 2008, 15(4): 461-463.
- [18] 李进霞, 康明丽, 王 佳, 等. 氧氟沙星包合物的制备、表征及其包合机制的分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(23): 2397-2401.
- [19] Seilkhanov T M, Nurkenov O A, Isaeva A Z, *et al*. Preparation and NMR spectroscopic studies of the supramolecular inclusion complex of anabasine and β -cyclodextrin [J]. *Chem Nat Comp*, 2016, 52(6): 1066-1068.
- [20] Ghosh A K. Spectrophotometric study of molecular complex formation of asphaltene with two isomeric chloranils [J]. *Fuel*, 2005, 84(2/3): 153-157.
- [21] Monika S, Samo A, Andrej Š. Effect of β -cyclodextrin on antioxidant activity of coumaric acids [J]. *Food Chem*, 2008, 110(3): 636-642.
- [22] 任 红, 郑少杰, 张小利, 等. 基于不同抗氧化机制的黄酮类化合物构效关系研究进展 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(2): 384-388.
- [23] 吕龙祥, 黄锁义, 莫斯锐, 等. 茉莉花茎糖类化合物抗氧化活性及其构效关系和作用机理研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(6): 1009-1014.