

文章编号:1673-1689(2007)05-0025-06

羟丙基- β -环糊精分子识别能力研究

袁超, 金征宇, 赵建伟, 袁信华

(江南大学 食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要:以复合物稳定常数为指标对羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)的分子识别能力进行了研究。通过还原一裂解法和甲基化分析确定了 HP- β -CD 样品的取代度和取代基分布。选取酚酞和甲基红分别作为大、小客体模型与 HP- β -CD 作用,用红外和紫外-可见光谱确定复合物的形成和复合形式,用分光光度法分别研究了两种复合物的稳定性,结合 HP- β -CD 的结构特性,总结出了 HP- β -CD 对客体的分子识别规律。对较大的客体,HP- β -CD 的识别能力低于母体 β -CD;对较小的客体,HP- β -CD 有较高的分子识别能力,特别是取代度 3.5 左右,取代基分布较平均的 HP- β -CD 与客体结合的稳定常数远大于母体 β -CD。

关键词:羟丙基- β -环糊精;分子识别;复合物;稳定常数;气质联用;红外光谱;紫外光谱

中图分类号: TS 201.2

文献标识码: A

Investigation of Molecular Recognition Ability of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrins

YUAN Chao, JIN Zheng-yu, ZHAO Jian-wei, YUAN Xin-hua

(Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The molecular recognition ability of hydroxypropyl- β -cyclodextrins (HP- β -CD) was investigated by measuring the stability constant of complexes which formed by HP- β -CD and guest molecules. The degree and distribution of substitution of HP- β -CD were determined by the reductive-cleavage method and methylation analysis. Phenolphthalein and methyl red were selected as the models for large and small guests to react with HP- β -CD. The formation and form of complexes were determined by infrared and ultraviolet-visible spectroscopies. The stability of the two kinds of complexes was investigated by spectrophotometry, combining the configuration characteristics of HP- β -CD, the molecular recognition rule of HP- β -CD were concluded. The molecular recognition ability of HP- β -CD was lower than β -CD to large guestes. With regarded to the small guest molecules, HP- β -CD has higher complex forming ability, especially of which the degree of substitution was about 3.5 and the distribution of substitution was even.

Key words: hydroxypropyl- β -cyclodextrin; molecular recognition; complex; stability constant; gas chromatography-mass spectrometry; infrared spectroscopy; ultraviolet spectroscopy

收稿日期:2007-01-04.

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(2001BA501A01B).

作者简介:袁超(1979-),男,山东泰安人,粮食、油脂与植物蛋白工程博士研究生。

通讯作者:金征宇(1960-),男,江苏扬州人,教授,工学博士,博导,主要从事碳水化合物研究。

Email:zjin@jiangnan.edu.cn

环糊精(cyclodextrin, CD)是一种由数个葡萄糖残基通过 α -1,4-糖苷键连接的环式低聚糖。这一环状结构提供了一个疏水性内部孔洞,许多羟基位于环的边缘,使得CD外表面具有亲水性,从而形成外亲水、内疏水的特殊结构^[1]。这种特殊的分子结构,使得CD具有分子识别(molecular recognition)能力并与合适的客体分子形成超分子(supramolecule)体系^[2]。

分子识别是指分子间弱作用力所表现的分子互补,分子识别的基础是非共价键力和分子间相互作用,从而导致动态、可逆和智能的超分子体系^[3]。CD借助其疏水空腔,在溶液中可以与客体互相识别,在范德华力、氢键和疏水力的作用下,将客体分子动态的包接入CD的空腔里,形成复合物超分子体系。从而提高客体分子的水溶性、稳定性和抗氧化、光分解能力,或达到缓释和立体分离效果。因此,近年来CD在食品、医药、化妆品、农业和分析化学等领域广泛应用^[4-6]。其中应用最多的是含有7个葡萄糖残基的 β -CD。但是 β -CD在C-2、C-3羟基之间形成分子内氢键,导致其在水中溶解度较低(1.85 g/dL, 20℃),限制了其应用^[7]。

羟丙基- β -环糊精(hydroxypropyl- β -cyclodextrin, HP- β -CD)是 β -CD的醚化衍生物,羟丙基的引入部分打开了 β -CD的分子内氢键,水溶性大大提高,并且经试验证明具有更高的安全性,被认为是很有潜力的母体CD替代品^[8,9]。HP- β -CD是由 β -CD在碱性条件下与环氧丙烷反应制得。低碱浓度下,C-2位羟基活性最强,取代主要发生在此位点;高碱浓度下,C-2,3,6位羟基都可被活化,由于C-6位空间位阻最小,取代基主要引入此位点。但总体上来说,取代基总是随机的分布在不同的葡萄糖残基上。而取代基的分布和取代度都会影响到HP- β -CD的分子识别能力,进而影响其应用。

研究分子识别能力最基本的参数是主客体复合物的稳定常数。HP- β -CD作为一种新型化合物,不论在超分子体系,还是在分子识别模拟酶研究中,其稳定常数都是重要的指导性参数。稳定常数不但会受到HP- β -CD本身取代度和取代基分布的影响,还会受到客体分子的结构和性质的影响^[10]。

有人研究过HP- β -CD与某些化合物的复合性能,但大多限于研究取代度对某种客体的影响。目前笔者还未见综合考虑HP- β -CD结构和客体分子对稳定常数影响的报道。

酚酞和甲基红都是疏水性化合物,而且都含有苯环,前者苯环以碳原子为中心,分别在3个不同

的方向上,形成立体的球状结构。后者苯环以N,N双键为中心,向两边延伸,形成线状结构。以酚酞和甲基红为客体,两者结构的差异可以更好反映HP- β -CD的分子识别能力。另外,酚酞和甲基红在溶液中随pH值而产生颜色变化,可以用分光光度法检测复合物的形成和稳定性。Rao等人曾研究了酚酞和CD羟丙基衍生物的相互作用^[8],Tawarah等人对甲基红和3种母体CD的复合物进行了研究^[11]。作者在分析HP- β -CD结构的基础上,首次选取酚酞作为“较大的”客体模型,甲基红作为“较小的”客体模型,利用它们在溶液中的吸光特性和主客体复合物形成对其吸光性的影响,设计试验,用分光光度法测定复合物的稳定常数。研究具有不同取代度和取代基分布的HP- β -CD与不同客体形成复合物的稳定常数,从而确定HP- β -CD的分子识别性能。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Trace MS气相色谱-质谱联用仪:美国Finnigan公司产品;Nexus型傅立叶变换红外光谱仪:美国Thermo Nicolet公司产品;UV-1201型紫外/可见分光光度计:北京瑞利分析仪器公司产品;AB135-S型电子分析天平:Mettler-Toledo公司产品;KQ-250B型超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司产品。

β -CDs:化学纯,中国医药集团上海化学试剂公司产品;HP- β -CD样品实验室参考文献^[12]的方法稍加改进后制备,纯度>99.0%,A组样品(1~4)为碱质量分数18%下制备,B组样品(5~8)为碱质量分数5%下制备;HP- β -CD对照品(9):USP级进口分装,日本wako公司产品,其它试剂均为市售分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 HP- β -CD的结构测定 HP- β -CD的取代度和取代基分布由Ciucanu等人^[13]的还原-裂解法和甲基化分析得到。HP- β -CD经预甲基化、水解和乙酰化得到乙酰化D-葡萄糖衍生物,用GC-MS进行分析。GC-MS条件:OV1701毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm),程序升温:起始温度150℃,以3℃/min升温至250℃,停留10 min,载气为氮气,EI源,离子化电压70 eV。

1.2.2 复合物的制备与定性 取过量的酚酞(甲基红)加入25 mL 0.04 mol/L HP- β -CD溶液中,并加入2.5 mL 0.04 mol/L碳酸钠(盐酸)溶液,密封

后置于磁力搅拌器上匀速搅拌 72 h,置 4 ℃ 冰箱保存 12 h,取出减压抽滤两次。取滤液、客体溶液与 HP-β-CD 溶液分别进行紫外-一可见光谱扫描。剩余滤液冷冻干燥得复合物固体样品。分别取 HP-β-CD、客体、HP-β-CD 与客体 1 : 1 混合物和复合物进行红外光谱检测。

1.2.3 CD 与酚酞稳定常数测定 配制浓度约 1.2 mmol/L 的 β-CD 和 HP-β-CD 储备液,取 0.375 mmol/L 的酚酞溶液 2.5 mL 加入各储备液(2 mL),然后分别加入 0.04 mol/L 碳酸钠溶液,用去离子水定容到 25 mL。得到的溶液在 30℃ 下搅拌(500 r/min,72 h),使分子识别反应达到平衡。在 550 nm 处测定吸光度,由于酚酞复合后为无色,在此波长处无吸收,因此可以确定溶液中游离酚酞的浓度 $c_{PP游}$ 。另外知道溶液中 CD 和酚酞的总浓度 c_{PP} 和 c_{CD} ,由于,

$$c_{PP} = c_{PP游} + c_{PP-CD} \tag{1}$$

$$c_{CD} = c_{CD游} + c_{PP-CD} \tag{2}$$

作为主客比 1 : 1 的复合物的稳定常数 K 可由方程(3) 计算得到。

$$K = \frac{c_{PP-CD}}{c_{PP游} \times c_{CD游}} = \frac{c_{PP} - c_{PP游}}{c_{PP游} \times (c_{CD} - c_{PP} + c_{PP游})} \tag{3}$$

1.2.4 CD 与甲基红稳定常数测定 CD 与甲基红的稳定常数由经典的相溶解度法测定。每种 CD 储备液分别取 2,4,6,8,10 mL,各加入过量的甲基红和 2.5 mL 盐酸(0.04 mol/L),用去离子水定容到

25 mL,得到的混合液在 30 ℃ 下搅拌(500 r/min,72 h),使分子识别反应达到动态平衡。在 520 nm 处测定吸光度,由于甲基红被 CD 包埋后在 520 nm 处吸光度不变,计算得到的为溶液中甲基红的总量。绘制的相溶解度曲线证明为明显得 1 : 1 复合。稳定常数 K 可由 Higuchi-Connors 方程计算得到。以上稳定常数试验至少重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 HP-β-CD 的结构分析

HP-β-CD 的结构信息通过对乙酰化 D-葡萄糖衍生物的质谱图进行分析得到。在电子轰击下,乙酰化 D-葡萄糖衍生物基本按已知原理裂解。分析结果见表 1。样品羟丙基的分布符合以往的报道。即低碱浓度下,取代主要发生在 C-2 位点;高碱浓度下,取代基主要引入 C-6 位点。另外,从表 1 中可以看出,A 组样品 2,3 位羟基端和 6 位羟基端的取代度比例接近于 1,取代基较平均的分布在分子两端。这是由于,高碱浓度下,C-2,3,6 位羟基都可被活化,由于 C-6 位空间位阻最小,取代度稍占优势,与 C-2,3 位点的取代度之和接近。B 组样品 2,3 位羟基端和 6 位羟基端的取代度比例远大于 1,取代基明显的集中在 2 位。因为在低碱浓度下,C-2 位羟基活性最强,首先被活化,取代主要发生在此位点。对照样品的结构与 B 组样品结构类似。

表 1 HP-β-CD 的取代基分布和各位点相对取代度
Tab. 1 Distribution of substituents and the respective relative DS value of hydroxyl groups in HP-β-CDs

取代度	样品								对照
	A 组				B 组				
	1	2	3	4	5	6	7	8	
DS(3)	0.18	0.50	0.57	0.98	0.88	1.18	1.90	1.98	1.43
DS(2)	1.24	1.53	2.51	3.24	1.59	2.97	3.61	5.10	2.85
DS(2+3)	1.43	2.03	3.08	4.22	2.47	4.15	5.51	7.08	4.28
DS(6)	1.78	1.92	2.78	4.48	0.66	0.91	1.67	2.20	1.25
DS(2+3)/ DS(6)	0.80	1.05	1.11	0.94	3.73	4.55	3.30	3.22	3.43
分子取代度	3.21	3.95	5.77	8.68	3.14	5.06	7.19	9.27	5.53

2.2 IR 分析

图 1 是酚酞及酚酞-HP-β-CD 复合物的红外光谱。可以看出,物理混合物的红外图谱是酚酞和 HP-β-CD 简单叠加的结果,3 380 cm⁻¹ 是 HP-β-CD 羟基的伸缩振动峰,形成氢键后键力常数减小,因

此产生宽而强的吸收;1 737 cm⁻¹ 处是酯羰基的伸缩振动峰,1 611 和 1 513 cm⁻¹ 是苯环骨架振动峰。在复合物的红外光谱中,依然有苯环骨架的振动峰,只是强度比原酚酞的弱,酯羰基的伸缩振动峰也依然存在,且稍向高波数移动,表明酚酞分子只有部

分进入 HP- β -CD 空腔内部,部分苯环和酯羰基并没有完全被 HP- β -CD 包埋。

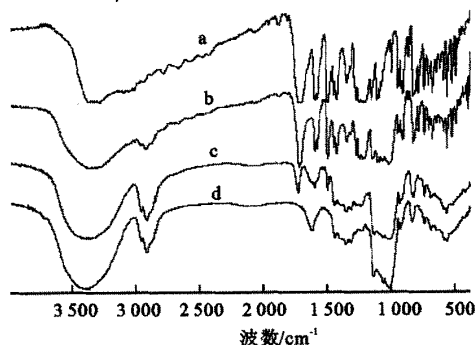


图1 酚酞(a)、HP- β -CD(d)及其混合物(b)和复合物(c)的红外光谱

Fig. 1 Infrared spectra of phenolphthalein (a), phenolphthalein/HP- β -CD mixture (b), complex (c) and HP- β -CD (d)

图2是甲基红和甲基红-HP- β -CD复合物的红外光谱。图中显示,混合物的谱图也是甲基红和 HP- β -CD 简单的叠加,1 712 cm^{-1} 处为甲基红羧基伸缩振动峰,1 601 cm^{-1} 是苯环骨架振动峰,1 366 cm^{-1} 是叔胺基的吸收峰。复合物的红外光谱只显示 HP- β -CD 的特征峰,说明甲基红的主体骨架全部进入 HP- β -CD 空腔内部,红外吸收被 HP- β -CD 空腔屏蔽。

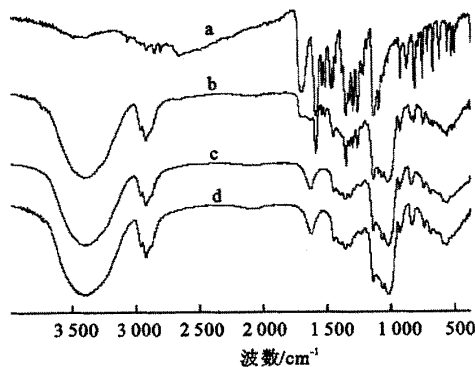


图2 甲基红(a)、HP- β -CD(d)及其混合物(b)和复合物(c)的红外光谱

Fig. 2 Infrared spectra of methyl red (a), methyl red/HP- β -CD mixture (b), complex (c) and HP- β -CD (d)

2.3 紫外-可见光谱分析

酚酞、HP- β -CD 及二者复合物的紫外-可见光谱见图3。在碱性溶液中酚酞以粉红色阳离子形式存在,整个酚酞离子形成一个大的共轭体系,并在 550 nm 处有特征吸收。当加入 HP- β -CD 后,部分酚酞与 HP- β -CD 通过范德华力、氢键和疏水作用,将客体分子动态的包接入 CD 的空腔里,形成复合

物超分子体系。酚酞被包接后又恢复成无色的分子状态,因此导致在 550 nm 处吸收降低,其他吸收峰也有所减弱或消失,这些都表明 HP- β -CD 可以识别酚酞并形成复合物。HP- β -CD 在整个扫描范围内都没有吸收。通过测定 550 nm 处的吸光度,可以确定溶液中未形成复合物的酚酞的浓度,进而计算得到复合物的稳定常数。

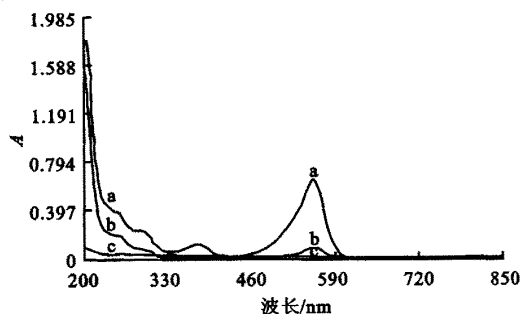


图3 酚酞(a)、HP- β -CD(c)及其复合物(b)的紫外-可见吸收光谱

Fig. 3 UV-Vis absorption spectra of phenolphthalein (a), HP- β -CD (c) and phenolphthalein - HP- β -CD inclusion complex (b)

甲基红、HP- β -CD 及两者复合物的紫外-可见光谱见图4。HP- β -CD 的吸光度依然接近于0。甲基红在酸性溶液中以红色阴离子形式存在,其紫外光谱主要在 277 nm 和 520 nm 处存在两个吸收峰。520 nm 处是整个甲基红阴离子共轭体系的吸收峰。277 nm 处是羧基的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁。甲基红加入到 HP- β -CD 溶液里后,导致甲基红的部分吸收峰减弱并红移,这也证明了 HP- β -CD 能与甲基红相互识别并形成复合物。由于甲基红在 520 nm 处的吸收并没有因为形成复合物而改变,因此可以通过测定此处的吸光度确定 HP- β -CD 对甲基红的增溶效果,用相溶解度法测定复合物的稳定常数。

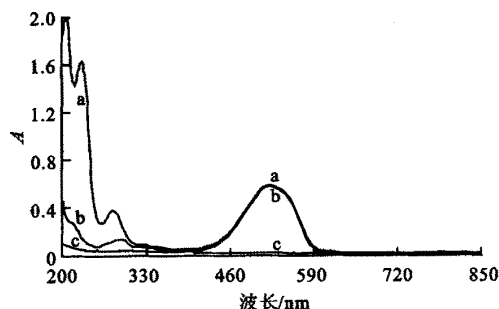


图4 甲基红(a)、HP- β -CD(c)及其复合物(b)的紫外-可见吸收光谱

Fig. 4 UV-Vis absorption spectra of methyl red (a), HP- β -CD (c) and methyl red - HP- β -CD inclusion complex (b)

2.4 稳定常数结果分析

由方程3求得CD与酚酞复合物的稳定常数见图5。A、B两组的稳定常数差别不大,总趋势都是随取代度的上升而下降。对样品品的稳定常数与实验室制备样品的接近。相同取代度下,B组样品对酚酞的分子识别能力略高,但两组HP-β-CD样品均低于母体β-CD。羟丙基的引入可以从两方面影响CD对客体的分子识别:一方面羟丙基会造成空间位阻,妨碍客体进入疏水空腔,降低复合物的稳定常数;另一方面羟丙基可能延长了CD疏水空腔的体积,或提供更多与客体形成氢键的机会,使合适客体与CD形成的复合物的稳定常数增大。酚酞由于分子较大,只能部分被CD包埋,因此对HP-β-CD来说,空间位阻的影响更大,导致复合物的稳定常数降低,并且取代度越高,稳定常数越低。

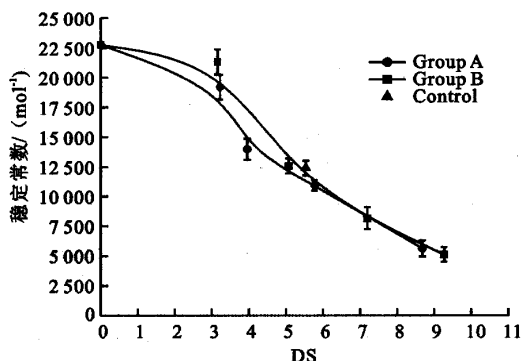


图5 酚酞与HP-β-CD复合物的稳定常数

Fig. 5 Stability constant of phenolphthalein inclusion complexes formed with HP-β-CD

根据相溶解度实验,通过Higuchi-Connors方程计算得到CD与甲基红复合物的稳定常数见图6。随取代度的上升,A组样品的稳定常数先上升,在取代度3.5左右达到最大,然后逐渐下降;B组样品则一直缓慢上升,在取代度6.8左右超过A组样品的稳定常数。在测量范围内,HP-β-CD与甲基红复合物的稳定性均高于母体β-CD与甲基红复合物的稳定性。原因可能是对于较小的线形分子甲基红,羟丙基的第二种影响,即使得复合物的稳定常数增加占了主导地位,高于空间位阻的影响。这种影响对于A组来说特别明显,A组样品的取代基较平均的分布在C-2,3,6位之间,这样有效的增加了空腔的体积又使空间位阻降至最低,随着取代基的增加这种效果更加明显,到取代度3.5时达到最大,然后,取代基的增加使得空间位阻的影响逐渐占了主导,使得稳定常数急剧下降,到取代度8.5左右甚至低于了母体β-CD。B组样品的羟丙基过于集

中在C-2位,使得羟丙基很难有效的增加空腔的体积,因此低取代度下与甲基红复合物的稳定常数远低于A组,只是略高于β-CD。但随着取代基的增多,逐渐形成延伸的空腔,使得稳定常数不断增加,并在取代度6.8左右超过A组样品。对样品品与甲基红复合物的稳定常数略高于结构类似的B组样品,但低于同取代度的A组样品。

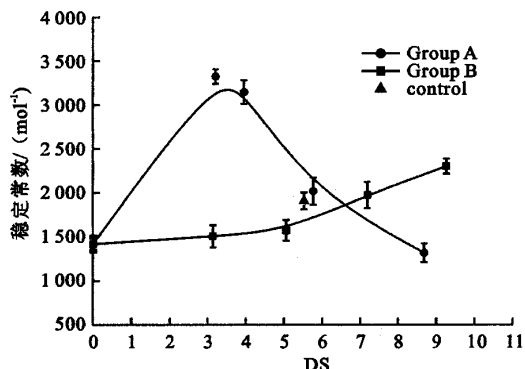


图6 甲基红与HP-β-CD复合物的稳定常数

Fig. 6 Stability constant of methyl red inclusion complexes formed with HP-β-CD

综合来看,由于HP-β-CD的空腔体积有限,对于较大的客体识别力较弱,难于形成复合物,复合物稳定性低于母体β-CD。对于较小的线形客体HP-β-CD有较好的分子识别能力,特别是取代度3.5左右,取代基平均分布的HP-β-CD,非常适合应用于小分子疏水性客体的分子识别和包埋应用。

3 结 语

通过还原-裂解法和甲基化分析确定了HP-β-CD样品的取代度和取代基分布,低碱浓度下,取代主要发生在C-2位点;高碱浓度下,取代基主要引入C-6位点。选取酚酞和甲基红分别作为大、小客体模型与HP-β-CD反应,用红外和紫外-可见光谱验证了复合物的形成和复合形式。以复合物稳定常数为指标对羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD)的分子识别能力进行了研究,用分光光度法分别研究了两种复合物的稳定性,结果表明,对较大的客体,HP-β-CD的识别能力低于母体β-CD;对较小的客体,HP-β-CD有较高的分子识别能力,特别是取代度3.5左右,取代基分布较平均的HP-β-CD与客体结合的稳定常数远大于母体β-CD。

参考文献(References):

- [1] Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin[J]. **Chemical Reviews**, 1998, 98: 1743—1753.
- [2] 童林芸. 环糊精化学[M]. 北京:科学出版社, 2001.
- [3] Buckingham A D, Legon A C, Roberts S M. Principles of molecular recognition[M]. Banff: Blackie Academic & Professional, 1993.
- [4] Del Valle E. Cyclodextrins and their uses: a review[J]. **Process Biochemistry**, 2004, 39: 1033—1046.
- [5] 崔波, 金征宇, 周万里, 等. 葡萄糖基(α -1 $\rightarrow$ 6) β -环糊精的波谱学数据与结构确证[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(1): 33—36.
- CUO Bo, JIN Zheng-yu, ZHOU Wan-li, et al. Spectral Data Analysis and Identification of Glucosyl(α -1 $\rightarrow$ 6) β -cyclodextrin[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(1): 33—36. (in Chinese)
- [6] 冯磊, 陶文沂, 敖宗华, 等. β -环糊精包结莪术挥发油的技术条件[J]. 食品与生物技术学报, 2003, 22(2): 67—70.
- FENG Lei, TAO Wen-yi, AO Zong-hua, et al. Studies on inclusion complex of volatile oil from rhizoma curcumae with β -Cyclodextrin[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2003, 22(2): 67—70. (in Chinese)
- [7] Szenté L, Szejtli J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development[J]. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 1999, 36: 17—28.
- [8] Rao C T, Fales H M, Pitha J. Pharmaceutical usefulness of hydroxypropylcyclodextrins: “e pluribus unum” is an essential feature[J]. **Pharmaceutical Research**, 1990, 7: 612—615.
- [9] Stella V J, Rajewski R A. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery[J]. **Pharmaceutical Research**, 1997, 14: 5560—5567.
- [10] Buvári-Barcza Á, Barcza L. Influence of the guests, the type and degree of substitution on inclusion complex formation of substituted- β -cyclodextrins[J]. **Talanta**, 1999, 49: 577—585.
- [11] Tawarah K M, Khouri S J. An equilibrium study of p-methyl red inclusion complexes with α - and β -cyclodextrins[J]. **Carbohydrate Research**, 1993, 245: 165—169.
- [12] Pitha J, Milecki J, Fales H, et al. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin: preparation and characterization; effects on solubility of drugs[J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 1986, 29(1): 73—82.
- [13] Ciucanu I, Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates[J]. **Carbohydrate Research**, 1984, 131: 209—217.

(责任编辑:朱明)