

郝佳,王春艳,张敏敏,等. α -萘乙酸/ β -环糊精包合物的溶出度及生理活性[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):75-77.

α -萘乙酸/ β -环糊精包合物的溶出度及生理活性

郝佳,王春艳,张敏敏,丁丽莺,袁放,高茜,任勇

(南京师范大学/江苏省医药超分子材料及应用重点实验室,江苏南京 210023)

摘要:为研究 α -萘乙酸/ β -环糊精的包合物对 α -萘乙酸的溶解度及溶出度的影响,并探究 α -萘乙酸/ β -环糊精的包合物对植物生理活性的影响,以紫外分光光度法测定 α -萘乙酸/ β -环糊精包合常数,研磨法制备包合物,差示热分析法验证包合物,紫外分光光度法测定 β -环糊精对 α -萘乙酸溶出度的影响,以玉米为材料,通过对其根的影响,探究包合物对植物生理活性的作用。结果表明: α -萘乙酸/ β -环糊精包合物的包合常数为 710 M^{-1} ;当包合质量比为 1:7 时, α -萘乙酸的溶出效果较好;包合物对玉米的根长、根重皆有较明显的提高作用。说明环糊精包合技术能提高 α -萘乙酸的溶出度,也能提高其对植物的生理活性的作用。

关键词: α -萘乙酸; β -环糊精;包合物;溶出度;生理活性

中图分类号: TQ452 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)07-0075-03

萘乙酸(naphthalene acetic acid)别称萘醋酸,通常所说的萘乙酸是指作为广谱型植物生长调节剂的 α -萘乙酸(α -naphthalene acetic acid, NAA)^[1],分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_2$,相对分子质量为 186.2。NAA 具有促进细胞分裂与扩大,诱导形成不定根,促进新陈代谢和光合作用,加速生长发育,增加坐果,防止落果,增强抗性,改变雌、雄花比率等特点^[1-2]。NAA 在农业上的应用浓度为 20~200 mg/L,虽然 NAA 在水中的溶解度为 420 mg/L,但其溶出度较低,溶解需较长时间才可达

到相应的浓度,为使用带来了一定的麻烦。

β -环糊精(β -cyclodextrin, β -CD)是一种“内疏水,外亲水”的环状低聚糖,能够将各种疏水性底物包合在其疏水空腔里,形成所谓的包合物^[3],且 β -CD 价廉易得,能显著改善物质的理化性质,如增加物质水溶性,提高物质溶出度等^[3-4]。 β -CD 包合物被广泛应用于植物生长调节剂的研究中,可增强其对植物生理活性的作用^[5]。彭敏等用核磁共振方法验证了 β -CD 与 α -NAA 的包合^[6]。但关于 α -NAA/ β -CD 包合物的溶解度、溶出度研究还没有明确的报导。

本试验着重研究了植物生长调节剂 NAA/ β -CD 的包合物对 NAA 溶解度及溶出度的影响,证明了 NAA 经过 β -CD 的包合,溶解度和溶出度均得到了一定的提高,这为农业生产提供了一定的方便。后期,以玉米为材料,通过 NAA 原料与 NAA/ β -CD 包合物同比例浸种后得到的植株的根长和根重

收稿日期:2013-01-09

作者简介:郝佳(1988—),女,江苏南京人,硕士研究生,研究方向为环糊精对植物生长调节剂的包合作用。E-mail: hjrainy@sina.com。

通信作者:任勇,副教授。Tel: (025)85891591; E-mail: renyongphd@126.com。

线激励电压为 65 kV、辐照时间为 3 min 时 PPO 活性最低,其值为 145.8 U。X 射线对黑花生真叶 PPO 活性影响最小的处理条件为:X 射线激励电压为 55 kV、处理时间为 4 min。从总体上来说随着 X 射线激励电压的增大 PPO 活性先增大后减小,随着辐照时间的增加 PPO 活性先增大后减小。当 X 射线激励电压较大时,PPO 活性较低,这可能是因为 X 射线能量过高会引起分子的极化,使电子跃迁至高能级,可能引起电离,从而促使发生化学反应。从而损害了 DNA 的结构,影响了 PPO 的表达^[9],从而使得 PPO 的活性降低。

参考文献:

- [1] Bhattacharya M, Luo Q, Corke H. Time-dependent changes in dough color in hexaploid wheat landraces differing in polyphenol oxidase activity[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 3579-3585.
- [2] 谢春艳, 宾金华, 陈兆平. 多酚氧化酶及其生理功能[J]. 生物学通报, 1999, 34(6): 15-17.
- [3] Whitaker J R, Lee C Y. Recent advances in chemistry of enzymatic browning: an overview [M]//Lee C Y, Whitaker J R. Enzymatic browning and its prevention. Washington DC: ACS, 1995.

- [4] Billaud C, Maraschin C, Nicolas J. Inhibition of polyphenoloxidase from apple by Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with L-cysteine under various conditions of pH and temperature [J]. LWT - Food Science and Technology, 2004, 37(1): 69-78.
- [5] Kanade S R, Suhas V L, Chandra N, et al. Functional interaction of di-phenols with polyphenol oxidase: Molecular determinants of substrate/inhibitor specificity [J]. FEBS J, 2007, 274(16): 4177-4187.
- [6] Pintom S, Siqueiraf P, Oliveiraa E, et al. A wounding induced PPO from cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings [J]. Phytochemistry, 2008, 69(12): 2297-2302.
- [7] Garcia - PalazonaA, Suthanthangjai W, Kajda P, et al. The effects of high hydrostatic pressure on β -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria x ananassa*) [J]. Food Chemistry, 2004, 88(1): 7-10.
- [8] Riener J, Noci F, Cronind A, et al. Combined effect of temperature and pulsed electric fields on apple juice peroxidase and polyphenoloxidase inactivation [J]. Food Chemistry, 2008, 109(2): 402-407.
- [9] 肖厚荣, 徐小龙, 解永树, 等. pH 诱导烟草多酚氧化酶二级结构变化的光谱学研究 [J]. 化学物理学报, 2004(2): 196-200.

的对比,证明经过 β -CD的包合,NAA对玉米的生理活性作用有一定提高。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 α -萘乙酸原料(上海源聚生物科技有限公司,含量>99%); β -CD(安徽山河药用辅料股份有限公司);纯净水(自制)。

1.1.2 仪器 UV-2550型紫外分光光度计(日本岛津公司);KQ-250DB型数控超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司);TA-60型差热分析仪(日本岛津公司);Explorer电子分析天平(美国Ohaus公司);THZ-92B台式恒温振荡仪(江苏金坛宏凯仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 测定波长的选择 用纯净水配制一定浓度的NAA溶液,在200~380 nm范围内扫描,选择281 nm作为其测定波长,在此处 β -CD无吸收。

1.2.2 NAA/ β -CD包合常数的测定 根据文献[7]的方法,采用紫外-可见光分光光度法测定包合常数。取少量NAA溶于纯净水中,配制溶液a(2.62 mmol/L),取溶液a配制8.96 mmol/L β -CD溶液b。取一定量溶液a进行紫外扫描,依次向体系中加入50 μ L溶液b,记录体系紫外吸光度的变化。

1.2.3 标准曲线的绘制 使用蒸馏水配制0.025 0 g/L NAA溶液,将其稀释成0.007 5~0.022 5 g/L的系列溶液,并于281 nm处测定上述溶液(包括母液)吸光度,绘制标准曲线。

1.2.4 NAA/ β -CD包合物的制备 采用研磨法制备包合物。精确称取NAA和 β -CD(重量比分别为1:7、1:14、1:21,摩尔比分别为1:1、1:2、1:3),加入适量纯净水,常温下研磨1.5 h呈糊状,30 $^{\circ}$ C以下减压真空干燥得固体包合物。

1.2.5 NAA/ β -CD包合物的鉴定 采用差示热分析法。取NAA、 β -CD、NAA: β -CD=1:7的包合物和物理混合物4种样品进行差示扫描热分析:以 Al_2O_3 为参比,样品重量为4.0 mg,测定气体为 N_2 ,升温范围为30~400 $^{\circ}$ C,升温速率为10 $^{\circ}$ C/min。

1.3 溶解度及溶出度研究

取4个150 mL的锥形瓶,分别加入30 mg NAA、240 mg NAA/ β -CD包合物(1:7)、450 mg NAA/ β -CD包合物(1:14)、660 mg NAA/ β -CD包合物(1:21)溶于80 mL纯净水中;以75 r/min摇床振摇,在2、4、6 min时分别取样,经0.22 μ m微孔滤膜过滤,分别测定281 nm处的紫外吸光度;取样后剩余的悬浊液继续振摇,24 h后经0.22 μ m微孔过滤膜过滤,测定其281 nm处的紫外吸光度。

1.4 NAA/ β -CD包合物对玉米生理活性的影响

试验材料采用江南花糯玉米种子,由江苏省农业科学院粮食作物研究所研制。选取籽粒饱满、大小一致的玉米种子,用NAA浓度为0.01、0.10、1.00、10.00 mg/L的NAA/ β -CD包合物(1:7)和水分别浸种玉米种子24 h后,采用相同的普通田园土,每个浓度播种10粒种子,于恒温光照培养箱(温度为25 $^{\circ}$ C,每天光照时间为14 h,光照强度为4 000 lx)进行

培养。13 d后,分别量取玉米苗根长和根重,计算平均值。

2 结果与分析

2.1 NAA/ β -CD包合常数的测定

环糊精与客体分子的包合是一个动态平衡的过程,包合物形成后会使客体分子的吸收光谱产生位移或吸收强度发生改变。紫外扫描显示,NAA在281 nm处有较强吸收,可以用紫外分光光度法测定其包合常数 K_a [7]。 K_a 反映环糊精与客体分子的包合强度,值越大,越易形成稳定的包合物。由文献[7]的公式及方法得到 K_a 值为710 M^{-1} ,说明NAA与 β -CD有一定的包合作用。

2.2 标准曲线的绘制

分别测定281 nm处紫外吸光度,绘制标准曲线(图1),线性回归得吸光度(D)-NAA浓度(C)标准方程为 $D = 29.667 C + 0.010 2$ ($r^2 = 0.999 1$)

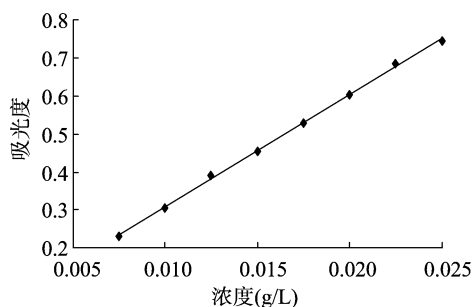
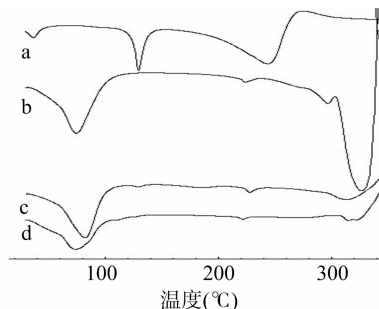


图1 NAA标准曲线

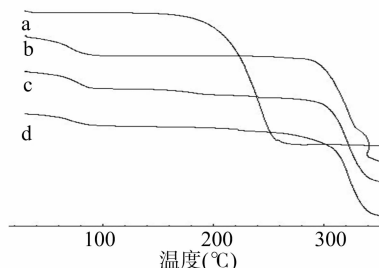
2.3 NAA/ β -CD包合物的鉴定

采用差示热分析方法来鉴定包合物。

各试验样品热分析图谱皆有明显差异。由图2-a(DTA分析图谱)可以看出,NAA(a)在130 $^{\circ}$ C有尖锐熔融峰(吸热),此为NAA熔点峰,熔点温度至273 $^{\circ}$ C的宽吸热峰表现了NAA受热分解; β -CD(b)在81 $^{\circ}$ C和310 $^{\circ}$ C处分别出现脱



a.DTA图谱



b.TGA图谱

a—NAA, b— β -CD, c—物理混合物, d—包合物

图2 NAA与 β -CD包合体系的DTA及TGA图谱

水峰和熔融分解峰;物理混合物(c)出现明显的 β -CD 和 NAA 吸热峰特征;而包合物(d)中 NAA 在 130 ℃ 的熔融峰和 273 ℃ 左右的吸热分解峰基本消失,273 ~ 310 ℃ 段曲线平坦无 β -CD 缓慢吸热分解的特征表现。

由图 2-b(TGA 图谱)可以看出,NAA(a)在 144.37 ~ 267.42 ℃ 熔融分解失重; β -CD(b)在 96.34 ℃ 前脱去包含水分,281.57 ℃ 开始熔融分解失重;而物理混合物(c)中非包含的 NAA 失重明显,且呈现出 90.13 ℃ 前的 β -CD 脱水 and 300.37 ℃ 后的分解失重特征;包合物(d)曲线保持了 β -CD 的脱水特征峰,但是无明显的 NAA 失重变化特征,91.4 ~ 302.29 ℃ 范围缓慢失重的曲线变化与物理混合物及单纯 β -CD 曲线皆有明显区别。

综合上述 DTA 和 TGA 结果分析可知,判断包合物已经形成。

2.4 溶出度研究

如“1.3”方法所示,振摇 2 min、4 min、6 min 和 24 h 后过滤,滤液稀释 20 倍,测得 281 nm 处吸光度,代入标准曲线得到 NAA 浓度,得到的增溶倍数如表 1 所示,同时对时间、NAA 浓度对比作出图 3。

表 1 各组样品振摇过后的增溶倍数

| 时间 | NAA | 增溶倍数 | | |
|-------|-----|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | NAA/ β -CD 包合物(1:7) | NAA/ β -CD 包合物(1:14) | NAA/ β -CD 包合物(1:21) |
| 2 min | 1 | 2.41 | 2.57 | 2.56 |
| 4 min | 1 | 2.17 | 2.29 | 2.45 |
| 6 min | 1 | 2.05 | 2.07 | 2.23 |
| 24 h | 1 | 1.07 | 1.14 | 1.29 |

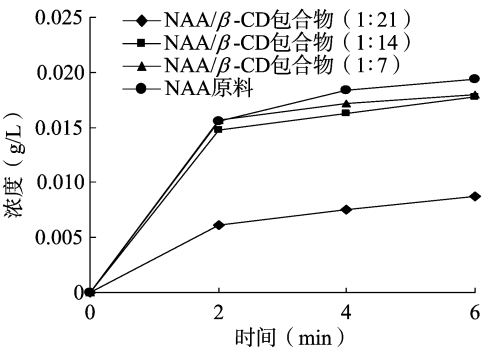


图3 各组样品短时振摇过后NAA浓度变化趋势

由图 3 可见,6 min 内 β -CD 对 NAA 的包含有较明显的增溶效果;随着包合物中 β -CD 含量的提高,NAA 的溶解度也随之提高;从时间上分析,2 ~ 6 min 内得到增溶倍数表现为逐渐降低(表 1)。 β -CD 包含 NAA 后,随着 β -CD 含量的提高,NAA 的溶解度有一定的提高,但各比例结果差别不大;但经过 24 h 后,包合物增溶效果明显降低,其 NAA 溶解度与原料药相近,结合表 1 内容,表明包合物增溶倍数较低。综合上述图表数据可知,短时振摇(2 ~ 6 min)的增溶倍数比 24 h 振摇大,说明 β -CD 对 NAA 的包含使 NAA 的溶出速率显著提高,在 2 min 内即可以使 NAA 浓度达到 294 mg/L,远大于农业要求的最高浓度 200 mg/L,满足了农业上生产的需要,为使用提供了方便;但包合作用并未大幅提高 NAA 的溶解度。

2.5 NAA/ β -CD 包合物对玉米生理活性的影响

在恒温光照培养箱中培养 13 d 后,小心取出完整的玉米苗,分别量取其根长和根重,结果如表 2 所示。

表 2 NAA/ β -CD 包合物处理后玉米的根生长变化

| NAA 浓度 (mg/L) | 玉米生理活性情况 | | | |
|---------------|-----------|-----------|----------|-----------|
| | 平均根长 (cm) | 根长增加率 (%) | 平均根重 (g) | 根重增加率 (%) |
| 0 | 93.80 | | 0.105 8 | |
| 0.01 | 107.50 | 14.61 | 0.106 0 | 0.18 |
| 0.10 | 116.63 | 24.34 | 0.113 2 | 6.99 |
| 1.00 | 120.30 | 28.25 | 0.130 8 | 23.63 |
| 10.00 | 126.00 | 34.33 | 0.127 9 | 20.89 |

由表 2 可以看出,NAA/ β -CD 包合物对玉米的根长、根重均有一定的正面影响。随着其中 NAA 浓度的提高,玉米根长增加,其活性增加率可达到 34.33%,明显大于对照组;平均根重基本与 NAA 浓度呈正相关,试验组皆大于对照组。说明 β -CD 对 NAA 的包含能够增强其对植物根的生理活性作用,使其在较低的浓度下就可达到预期的效果。

3 结论

NAA/ β -CD 的包含常数为 710 M⁻¹左右,经差示热分析证明包合物已经形成。 β -CD 包含 NAA 后对 NAA 的溶出度有显著提高,随着 β -CD 含量的提高,NAA 的溶解度有一定的提高。但从节省原料、经济环保上综合考量,选用 NAA 和 β -CD 重量比 1:7 的包合物最佳,该比例的包合物可在 2 min 时溶出速率达到原料药 NAA 的 2.41 倍,使 NAA 可以在水中较短时间内浓度达 294 mg/L,远大于其在农业上应用的最大浓度 200 mg/L,从而为农业生产提供了较大的便利。后期玉米生理活性试验证明,玉米种子在经较低浓度的 NAA/ β -CD 包合物浸种后种植,可使其根长和根重分别提高 34.33% 和 23.63%,这降低了 NAA 在农业上的使用浓度,也提高了其对植物活性的作用,有良好的应用前景。

参考文献:

[1]林海斌. α -萘乙酸:植物生长的调节剂[J]. 化学教育,2009 (10):6-7.
[2]王雪娟,魏金旺. α -萘乙酸的分析方法研究[J]. 色谱,2000,18 (6):563-565.
[3]任 勇,陈文华. 药物-环糊精超分子体系研究进展[M]//郑筱萸,廖清江. 药学前沿. 北京:中国医药科技出版社,2001:46-59.
[4]王亚娜,任 勇,陆亚鹏,等. 苯丙醇/ β -环糊精包合作用研究[J]. 中国药科大学学报,2005,36(1):13-17.
[5]宋乐新,王海名,杨 燕. 邻-甲氧基苯酚和 α -、 β -环糊精包合现象的理论与实验研究[J]. 化学学报,2007,65(16):1593-1599.
[6]彭 敏,孔旭新,余亦华,等. 环糊精和 α -萘乙酸包络物的核磁共振研究[J]. 高等学校化学学报,2006,27(5):939-943.
[7]王亚娜,孙俊梅,余丽丽,等. 环糊精及衍生物/药物包合常数的测定方法及其应用[J]. 药学进展,2004,28(1):23-28.