

不同环糊精对纳他霉素的包埋效果的研究

张曦文,蔡灿欣,李志刚,庞松雅,薛文菁,王金鹏*,金征宇

(江南大学食品科学与技术国家重点实验室,江南大学食品学院,江苏无锡 214122)

摘要:解析了 α -、 β -和 γ -环糊精对纳他霉素的相溶解度图,发现 α -、 β -环糊精呈现 A_L 型,包埋常数分别为 3.803×10^{-5} 和 1.362×10^{-3} , γ -环糊精呈现 A_N 型, α -、 β -和 γ -环糊精水溶液分别能够使纳他霉素的溶解度增加4.8、15.5、104倍,而组成为 α -、 β -和 γ -环糊精的复合环糊精(CD- C_{100})能够使纳他霉素的溶解度增加约157倍,对纳他霉素的包埋率为57.15%,经复合环糊精包埋的纳他霉素60℃下储藏6d后,保留率高达98.8%以上。本研究将为扩大纳他霉素在食品中的应用范围提供参考。

关键词:环糊精,包埋,纳他霉素

Study on the inclusion behavior between CDs and natamycin

ZHANG Xi-wen, CAI Can-xin, LI Zhi-gang, PANG Song-ya, XUE Wen-jing, WANG Jin-peng*, JIN Zheng-yu

(State Key Lab of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The phase soluble diagram of α -、 β -、 γ -cyclodextrin with natamycin was analyzed. Results showed that α - and β - cyclodextrin gave A_L type, and the inclusion constants were calculated as 3.803×10^{-5} and 1.362×10^{-3} , separately. While γ -cyclodextrin gave A_N type. The water solubility enhancement folds for α -、 β -、 γ -cyclodextrin were 4.8, 15.5, 104 folds, respectively. Furthermore, composite cyclodextrin could also form inclusion with natamycin, and the water solubility enhancement was calculated as 157 folds. The inclusion rate of composite cyclodextrin for natamycin was 57.15%. And the retention rate was 98.8% for natamycin in composite cyclodextrin after storing at 60℃ for 6 days. This study will append applied scope in food for natamycin.

Key words: cyclodextrin; inclusion; natamycin

中图分类号: TS236.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)02-0080-04

纳他霉素是一种大环内酯类抗生素,是GB2760规定的除了乳酸链球菌素之外允许添加的另一种抗生素,可以用于食品中防腐保鲜^[1],在欧洲广泛用于面包、奶酪等产品中^[2]。然而纳他霉素的结构不太稳定,在光、氧、高温等条件下易发生降解,储藏期间抗菌性能容易下降;此外,纳他霉素的溶解性能很差,在水中的溶解度仅有30~50mg/L,这大大限制了纳他霉素在使用时的用量范围^[3],而固相状态的抗生素在使用时不仅用量大,并且很难分布均匀,从而降低抗菌效果;目前采用的对纳他霉素进行增溶的方法主要是将纳他霉素进行衍生化处理,从而增加其溶解性,但衍生化过程繁琐,且衍生化的产物抗菌性能有所下降^[4],因此保全纳他霉素原有的结构形态,在此基础上对其进行增溶显得尤为重要。

环糊精是指由葡萄糖通过 α -1,4-糖苷键连接而成的环状低聚糖,因其内疏水、外亲水的性质能够与客体分子形成超分子复合物,很好的改善客体分子对光、氧等的稳定性,并增加客体分子的水溶性,在超

分子化学、医药、食品、化妆品等领域得到了广泛的应用^[5-6],然而单一的环糊精因受空腔尺寸局限而使其对客体分子具有很强的选择性,例如已经报道的环糊精对纳他霉素的包埋效果发现,不同环糊精对于纳他霉素增溶效果不同^[7],在前人的研究基础上,本研究团队发现,同时含有 α -、 β -、 γ -环糊精的环糊精复合物具有更高的水溶特性和对客体分子更好的增溶效果,然而未见关于该复合环糊精对于纳他霉素包埋的相关报道。但因复合环糊精体系复杂,为了对比研究复合环糊精对纳他霉素的增溶效果与常见环糊精的区别,本文从不同环糊精对纳他霉素的相溶解度图、包埋常数、及溶解度增加等入手,探讨未经纯化的复合环糊精对纳他霉素的增溶效果和稳定效果。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

复合环糊精、 α -、 β -、 γ -环糊精 分析纯,江苏丰园生物技术有限公司;纳他霉素 分析纯,购自国药集团;甲醇 分析纯,购自国药集团。

AB104-N电子天平 METTLER TOLEDO; TU-1900双光束紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; KQ5200超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 实验方法

收稿日期:2013-06-13 * 通讯联系人

作者简介:张曦文(1991-),女,大学本科,研究方向:食品质量与安全专业。

基金项目:国家自然科学基金重点项目(31230057);“十二五”科技支撑计划项目(2012BAD37B03)。

1.2.1 复合环糊精-纳他霉素包合物的制备 称取200mg的复合环糊精,溶于10mL甲醇中,加入2mg的纳他霉素,将该混合物超声处理5min,然后避光、冲氮并于40℃的振荡水域中100r/min振荡24h,真空干燥,将所得粉末用甲醇洗涤数次^[8],干燥所得产品即为环糊精-纳他霉素包合物。

1.2.2 纳他霉素的定量分析 以纳他霉素的吸收波长304nm作为检测波长^[7]。制作标准曲线时,将纳他霉素溶解于甲醇溶液中,分别配制浓度为3、4、5、6、7、8、9mg/L的样品,以纳他霉素浓度为横坐标,吸光值为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.3 相溶图的绘制 分别配制浓度为100、20、10、2、1mmol/L的 α -环糊精溶液,浓度为10、2、1、0.2、0.1mmol/L的 β -环糊精溶液和浓度为150、30、15、3、1.5mmol/L的 γ -环糊精溶液,各取10mL装入棕色瓶中,准确称取纳他霉素0.01g置于各个瓶中,摇匀,充氮排尽瓶中空气,然后放入电热恒温振荡水槽,于40℃、150r/min振荡24h,振荡结束后取出并采用0.45 μ m滤膜过滤处理,将滤液稀释十倍,测定304nm下的吸光度值,代入纳他霉素标准曲线,求出溶解在水中的纳他霉素的量,以环糊精的浓度为横坐标,纳他霉素的浓度为纵坐标绘制相溶解度图。

1.2.4 包埋常数计算 对于化学计量比为1:1的环糊精包合物,存在如下平衡:



$$a-x \quad b-x \quad x$$

此平衡的稳定常数公式为:

$$K = \frac{[x]}{[a-x][b-x]} \quad \text{式(1)}$$

式中,a表示环糊精的总浓度,b表示客体的总浓度,x表示包合物的浓度;如果以 S_0 表示客体原有溶解度,当客体被CD包埋后其溶解度增加,在溶液中的客体总浓度 $b = S_0 + x$,即 $x = b - S_0$,将其代入上式得:

$$K = \frac{[b - S_0]}{[a - (b - S_0)]S_0} \quad \text{式(2)}$$

换算后可得:

$$b = \frac{KS_0}{1 + KS_0} a + S_0 \quad \text{式(3)}$$

由相溶解度曲线直线斜率即可直接求解包埋常数 K_c :

$$K_c = \text{斜率} / S_0 (1 - \text{斜率}) \quad \text{式(4)}$$

1.2.5 反应时间对环糊精包埋纳他霉素的影响 分别称取 α -CD 2.43g、 β -CD 2.8375g、 γ -CD 3.2425g,加水定容至250mL容量瓶,配制成10mmol/L的溶液,转移至250mL的锥形瓶,静置过夜后加入过量纳他霉素,用保鲜膜封口,超声5min,置于水浴荡摇器(透明盖子上粘贴报纸避光)45℃水浴振荡,在反应2、4、6、8、10、12、24h时分别用10mL针筒抽取4mL上清液过0.45 μ m针头式过滤器过滤注入5mL离心管。用1mL移液枪吸取各纳他霉素: α -CD包合物溶液1mL,纳他霉素: β -CD包合物、纳他霉素: γ -CD包合物溶液各0.2mL,加75%甲醇定容稀释至25mL具塞刻度试管,用紫外分光光度计于304nm波长处测其吸光值(以75%甲醇溶液为参比)。

1.2.6 复合环糊精对纳他霉素的增溶效果研究 通过液质联用分析复合环糊精中各CD的含量(标样和检测样均配成1mg/mL的溶液)。

称取复合环糊精10g,加水定容至100mL容量瓶,配制成100mg/mL的储备液。每种储备液用10mL移液管分别吸取1、2、4、6、8、10mL,转入50mL离心管,再用10mL移液管移入适量水定容至10mL。充氮包扎好的离心管超声5min,45℃水浴振荡24h,在3000r/min下离心10min。用10mL针筒抽取4mL上清液过0.45 μ m滤膜注入5mL离心管。用1mL移液枪分别吸取0.5、0.5、0.25、0.2、0.15、0.1mL,加75%甲醇定容稀释至25mL具塞刻度试管,用紫外分光光度法测其吸光值。各平行三次。

1.2.7 复合环糊精包合物储藏稳定性实验 称取0.2g复合环糊精-纳他霉素包合物至50mL离心管,再用10mL移液管移入10mL水,充氮包扎好的离心管超声5min,45℃水浴振荡24h,在3000r/min下离心10min,上清液过0.45 μ m滤膜转入10mL离心管。

由于在中性pH时,纳他霉素浓缩液可在50℃下放置几天而无明显影响^[9],且有文献将纳他霉素含量为20mg/L的较稀的包合物溶液置于4℃环境下无明显影响^[10],故将较高浓度的液体样品置于60℃烘箱,分别于0、1、2、3、4、5、6d时用1mL移液枪从中吸取0.5mL,加75%甲醇定容稀释至25mL具塞刻度试管,用紫外分光光度法测其吸光值。测定结果以时间(d)为横坐标,保留率即各天与0d时的吸光值的比值(以百分比形式,保留小数点后一位)为纵坐标,绘制曲线。

2 结果与分析

2.1 纳他霉素标准曲线

采用分光光度法测定的纳他霉素标准曲线如图1所示,标准曲线的回归方程为 $y = 0.0653x + 0.0338$,方程的相关系数 R^2 达到0.999,表明拟合良好,方程可用,吸光度的线性范围在0.2~0.8之间,表明方法灵敏度符合常规分光光度法的测定范围,纳他霉素吸收度与质量浓度在3~10mg/L内呈良好的线性关系。

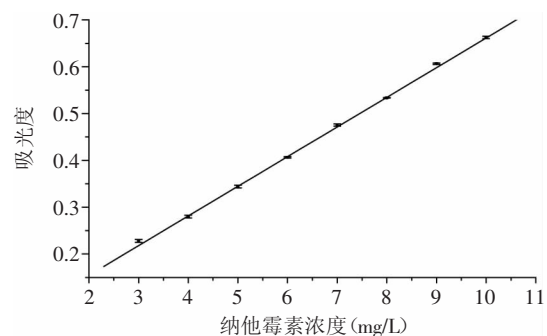


图1 纳他霉素的标准曲线

Fig.1 The standard curve of natamycin

2.2 包埋时间的确定

分别研究了 α -、 β -、 γ -环糊精对纳他霉素形成包合物的包埋时间,结果见图2。

从图2可以看出,当包埋时间达到12h以上时,三种包合物中纳他霉素的量变化不大,为保证复合物

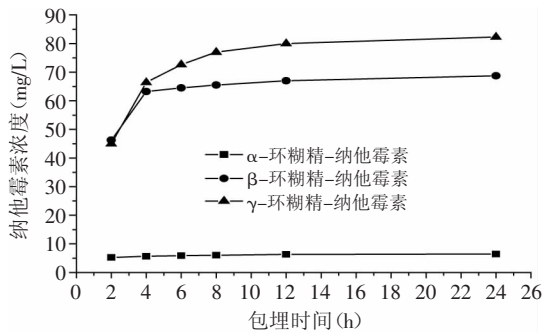


图2 纳他霉素的包埋时间曲线图

Fig.2 Inclusion time for natamycin

的充分形成,包埋时间选为24h。

2.3 相溶解度图

分别测定了 α -、 β -、 γ -环糊精对纳他霉素的相溶解度图,结果见图3。

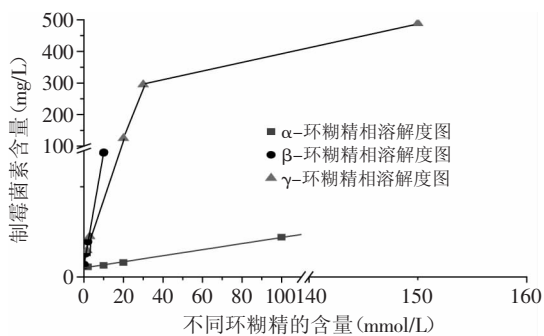


图3 环糊精相溶解度曲线

Fig.3 Phase solubility curves for various cyclodextrin

结合图3及Higuchi和Connors的报道^[1]可知, α -、 β -环糊精的相溶解度曲线归属 A_L 型,说明和纳他霉素形成1:1的包合物, γ -环糊精的相溶解度曲线属于 A_N 型,表明和纳他霉素形成复合物时并非按照1:1的比例形成。

2.4 不同环糊精对纳他霉素的包埋常数

包埋常数大小,表明了环糊精对客体分子的包埋能力。据图3得到纳他霉素的 S_0 为45℃下在水溶液中的饱和溶解度,其值为63.71mg/L,根据式(4)计算得到 α -环糊精的包埋常数为 $K_C=2.3494/63.71 \times (972-2.3494) = 3.803 \times 10^{-5}$, β -环糊精的包埋常数为 $K_C=90.6339/63.71 \times (1135-90.6339) = 1.362 \times 10^{-3}$,表明 β -环糊精对于纳他霉素具有明显优于 α -环糊精的包埋能力。优于 γ -环糊精与纳他霉素形成包合物的包埋比非1:1,无法依据式(4)计算得到 γ -环糊精对纳他霉素的包埋常数,但从图3的相溶解度图可以看出, γ -环糊精对纳他霉素的增溶效果明显优于 α -环糊精和 β -环糊精。

2.5 复合环糊精对纳他霉素的增溶效果研究

复合环糊精(CD-C₁₀₀)经LC-MS测定主要成分为 α -、 β -、 γ -环糊精(4.07:1:0.14= α -环糊精: β -环糊精: γ -环糊精,图未列出),经测定其溶解度约为54.4g/100mL水,其对纳他霉素的增溶效果见图4。由图4可以看出,随着复合环糊精浓度增加,纳他霉素的溶解度线性增加。经测定,复合环糊精对纳他霉素的包埋率为57.15%,而对纳他霉素的增溶效果明显优于常见的

三种环糊精(见表1),复合环糊精的饱和溶液能够使纳他霉素的溶解度增加约157倍,远远大于 β -环糊精饱和溶液对纳他霉素的增溶效果(增溶15.5倍),而两中环糊精的价格相差不大,这为纳他霉素水溶性的有效增加提供了经济的原料和可行的方法,不仅能够扩大纳他霉素的应用范围,而且能够拓展复合环糊精的应用领域。

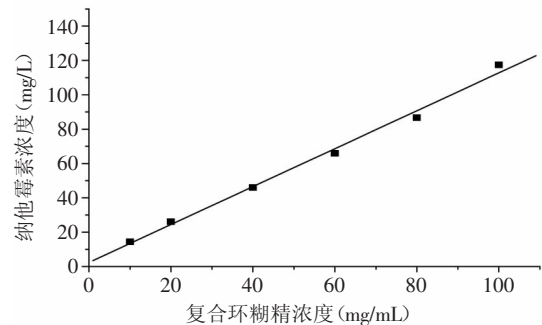


图4 复合环糊精对纳他霉素的增溶效果

Fig.4 Solubility enhancement for composite cyclodextrin to natamycin

表1 不同环糊精饱和溶液对纳他霉素的增溶效果

Table 1 The solubility enhancement of natamycin by various CDs

环糊精	饱和水溶液浓度(mg/mL)	纳他霉素浓度(mg/L)	纳他霉素溶解度增加倍数
α -CD	97.2	306.4	4.8
β -CD	11.35	985.5	15.5
γ -CD	194.55	6617.5	104
CD-C ₁₀₀	544	10024.6	157

2.6 复合环糊精对纳他霉素稳定性的影响

采用60℃加速储藏实验探索了复合环糊精对纳他霉素稳定性的影响,结果见图5。由图5可以看出,储藏6d的包合物中纳他霉素的残余量高达98.8%,纳他霉素的耐热性及储藏稳定性得到明显的改善。

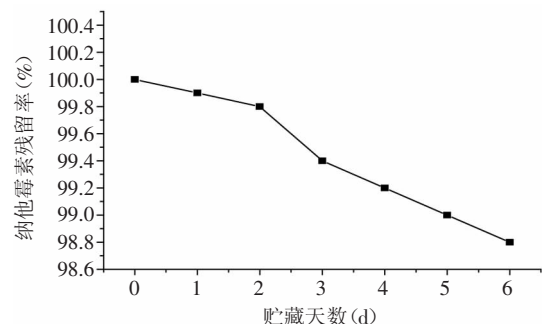


图5 复合环糊精-纳他霉素包合物的60℃储藏稳定性

Fig.5 Store stability of complexed cyclodextrin-natamycin at 60°C

3 结论

3.1 α -CD、 β -CD的纳他霉素的溶解度呈线性增加,相溶解度曲线属于 A_L 型,而 γ -CD的相溶解度图展现出线性负偏差,即为 A_N 型。经计算, α -CD、 β -CD对纳

(下转第86页)

参考文献

- [1] 何锦,李勇. 石榴化学成分及其保健功能的研究进展[J]. 粮油食品科技,2012,20(2):42-45.
- [2] 董周永,郭松年,赵国建,等. 石榴果皮提取物抑菌活性研究[J]. 西北植物学报,2008,28(3):582-587.
- [3] Tiwari B K, Valdramidis V P, O' Donnell C P, *et al.* Application of natural antimicrobials for food preservation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2009,57(14):5987-6000.
- [4] 乔树华. 石榴皮抑菌活性的初步研究[D]. 北京:中国农业科学院,2009.
- [5] Kanatt S R, Chander R, Sharma A. Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products[J]. International Journal of Food Science & Technology,2010,45(2):216-222.
- [6] Al-Zoreky N S. Antimicrobial activity of pomegranate(*Punica granatum* L.) fruit peels[J]. International Journal of Food Microbiology,2009,134(3):244-248.
- [7] Hayrapetyan H,Hazeleger W C,Beumer R R. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate(*Punica granatum*) peel extract in meat pate at different temperatures[J]. Food Control,2012,23(1):66-72.
- [8] 李巨秀,张小宁,李伟伟. 不同品种石榴花色苷、总多酚含量及抗氧化活性比较研究[J]. 食品科学,2011,32(23):143-146.
- [9] 朱静,陆晶晶,袁其朋. 大孔吸附树脂对石榴皮多酚的分离纯化[J]. 食品科技,2010,35(1):188-193.
- [10] Seeram N, Lee R, Hardy M L, *et al.* Rapid large scale

- purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry[J]. Separation and Purification Technology,2005,41(1):49-55.
- [11] 赵艳红,李建科,李国荣. 石榴皮多酚纯化及其抗氧化活性表征[J]. 食品科学,2010,31(11):31-37.
- [12] 张茜,贾冬英,姚开,等. 大孔吸附树脂纯化石榴皮多酚[J]. 精细化工,2007,24(4):345-349.
- [13] Aqil F,Munagala R,Vadhanam M V,*et al.* Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk[J]. Food Research International,2012,49(1):345-353.
- [14] 焦中高,刘杰超,周红平,等. 枣果中酚类物质的高效液相色谱分析[J]. 食品与发酵工业,2008,34(3):133-136.
- [15] 曲文娟,张渭洁,徐敏瑶,等. 高效液相色谱测定石榴皮水提取物中4种多酚化合物的含量[J]. 分析测试学报,2011,30(12):1425-1429.
- [16] 赵海燕,杨永红,刘泰然,等. 高效液相色谱法同时测定保健食品中的安石榴甙和鞣花酸[J]. 中国食品卫生杂志,2012,24(4):333-335.
- [17] Zhou Honghao, Yuan Qipeng, Lu Jingjing. Preparative separation of punicalin from waste water of hydrolysed pomegranate husk by macroporous resin and preparative high-performance liquid chromatography[J]. Food Chemistry,2011,126(3):1361-1365.
- [18] Klanecnik A, Piskemik S, Jergek B, *et al.* Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts[J]. Journal of Microbiological Methods,2010,81(2):121-126.

(上接第82页)

他霉素的包埋常数分别为 3.803×10^{-5} 和 1.362×10^{-3} ;虽然 γ -CD无法计算其包埋常数,但在低浓度时就表现出明显优于 α -、 β -环糊精的包埋特性。

3.2 饱和的 α -、 β -、 γ -环糊精水溶液能够分别使纳他霉素的溶解度增加4.8、15.5、104倍,而复合环糊精能够使纳他霉素的溶解度增加约157倍。

3.3 复合环糊精包埋纳他霉素的包埋率为57.15%,在60℃下储藏6d后发现,经复合环糊精包埋的纳他霉素的保留率高达98.8%以上,表明复合环糊精对于增加纳他霉素的储藏稳定性及热稳定性具有较好的作用。

3.4 复合环糊精作为廉价的原料,为提高纳他霉素的溶解度,进而增加其在食品中的应用范围提供依据。

参考文献

- [1] Natamycin. Code of federal regulations[M]. USA:Federal Register,2001.
- [2] Stark J. Permitted preservatives-natamycin[M]. USA:Academic Press,2000.
- [3] Schaffner CP,Mechlinski W. Polyene macrolide derivatives. II. Physical-chemical properties of polyene macrolide esters and their water soluble salts[J]. The Journal of Antibiotics,1972,25:259-260.
- [4] Korteweg G C J, Szabo K L H, Rutten A M G, *et al.* Some

pharmacological properties of pimaricin and possible clinical application of this antifungal antibiotic[M]. In International Symposium of Chemotherapy,1963:261-272.

- [5] 金征宇,徐学明,陈寒青,等. 环糊精化学——制备与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2008.
- [6] 金征宇,顾正彪,童群义,等. 碳水化合物化学——原理与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2007:142-150.
- [7] John L, Koonts J E. Formation of natamycin:cyclodextrin inclusion complexes and their characterization[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry,2003,51:7106-7110.
- [8] Wang J,Jin Z,Xu X. Gamma-cyclodextrin on enhancement of water solubility and store stability of nystatin[J]. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry:DOI:10.1007/s10847-012-0281-y.
- [9] 王贵芳,赵少华. 那他霉素的特性及其在食品中的应用[J]. 中国食品添加剂,2006(2):145-149.
- [10] Koontz J L, Marcy J E, Barbeau W E, *et al.* Stability of natamycin and its cyclodextrin inclusion complexes in aqueous solution[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2003,51(24):7111-7114.
- [11] Higuchi T, Connors K A. Phase-solubility techniques[J]. Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation,1965(4):117-212.