

超临界二氧化碳注入法制备 α -生育酚/ β -环糊精复合物

沈佩琼¹, 孙丽君¹, 赵翔宇², 赵亚平^{1,*}

(1.上海交通大学化学化工学院, 上海 200240; 2.江南大学化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:以 β -环糊精为载体, α -生育酚为模型物, 采用超临界二氧化碳注入法制备 α -生育酚/ β -环糊精固体复合物。考察注入压力、注入温度和注入时间等参数对 α -生育酚负载量的影响以及复合物在水相中的分散性。用紫外-分光光度法测定复合物的负载量, FTIR、DSC 和 TGA 对复合物进行表征。结果表明:随着注入压力和温度的增加, α -生育酚的负载量先增大后减小, 当温度 35℃、压力 18MPa、注入时间 1h 时, 负载量最高达 38.7%; 制备的复合物能在水相中均匀分散。

关键词:超临界二氧化碳注入法; α -生育酚; β -环糊精; 复合物

Preparation of α -Tocopherol/ β -Cyclodextrin Complex Using Supercritical Carbon Dioxide Impregnation Technology

SHEN Pei-qiong¹, SUN Li-jun¹, ZHAO Xiang-yu², ZHAO Ya-ping^{1,*}

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

2. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The preparation of α -tocopherol/ β -cyclodextrin complex by supercritical carbon dioxide impregnation technology was studied. The effects of process parameters, including pressure, temperature and reaction time on α -tocopherol loading and the disperability of α -tocopherol/ β -cyclodextrin complex in water were studied. The determination of α -tocopherol loading was carried out using ultraviolet spectrophotometer, and FTIR, DSC and TGA were used for the characterization of α -tocopherol/ β -cyclodextrin complex. The results showed that α -tocopherol loading first rose and then declined with increasing pressure and temperature, and reached up to 38.7% at 35 °C, 18 MPa and impregnation time of 1 h, and that the prepared complex could disperse homogeneously in water.

Key words: supercritical CO₂ impregnation technology; α -tocopherol; β -cyclodextrin; complex

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)08-0033-04

生育酚, 又名 VE, 是一种脂溶性维生素。天然 VE 有 8 种类似物, 其中以 α -生育酚(图 1a)最为常用且生物活性最高^[1-2]。 α -生育酚不仅具有显著的抗氧化活性, 而且能消除体内自由基, 预防心血管疾病和癌症。由于 α -生育酚中游离的酚羟基易在氧化剂、紫外线的作用下生成醌而失效, 因此有必要将生育酚和生物相容性聚合物制成复合物来提高其稳定性; 另外, 生育酚在常温下呈液态, 极难在水中分散, 与水溶性物质制成固体复合物还可以提高其在水中的分散性^[3-4]。

环糊精是由 D-葡萄糖分子以 1,4-糖苷键连接, 具有内疏水, 外亲水筒式结构的环状低聚糖, 常被用来

作为载体与水难溶性药物或不稳定物质形成复合物, 增加药物在水中的溶解性和提高物质的稳定性, 其中以 β -环糊精(图 1b)应用最广泛^[5-7]。

目前制备固体复合物的方法主要有: 揉捏法、共蒸发法、冷冻干燥法, 但是这些方法在制备过程中可能会破坏生育酚, 且存在有机溶剂残留, 因此限制了产品的应用^[8]。超临界二氧化碳适中的临界温度和惰性气体性质可以避免热敏性和易氧化物质的破坏; 其低黏度、低表面张力和高渗透性以及无需后续处理, 大大节省了时间, 提高了制备效率^[9-12]。本实验以 β -环糊精为载体, α -生育酚为原料, 用超临界二氧化碳注入

收稿日期: 2010-07-13

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA10Z350); 国家自然科学基金项目(20976103)

作者简介: 沈佩琼(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为超临界流体应用。E-mail: shenpq@sjtu.edu.cn

* 通信作者: 赵亚平(1962—), 男, 教授, 博士, 研究方向为超临界流体的化学化工过程及纳米营养物制备。

E-mail: ypzhaop@sjtu.edu.cn

法制备 α -生育酚/ β -环糊精复合物, 考察温度、压力和时间等工艺参数对生育酚负载量的影响, 旨在为生育酚在制药和食品工业的应用提供参考。

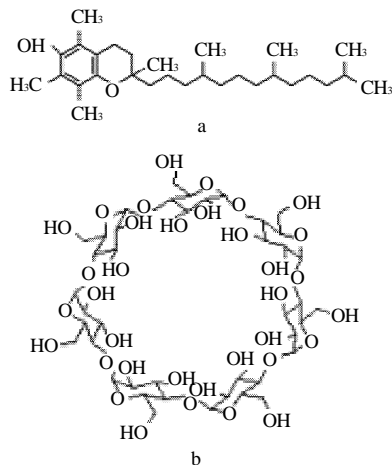


图1 α -生育酚结构图(a)和 β -环糊精结构图(b)

Fig.1 Structures of α -tocopherol (a) and β -cyclodextrin (b)

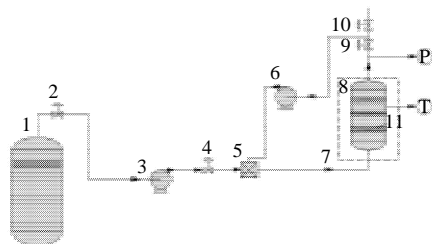
1 材料与方法

1.1 材料与试剂

DL- α -生育酚(食品级) 德国 BASF 公司; β -环糊精(生化级) 上海基星生物科技有限公司; 二氧化碳气体(纯度为 99.9%) 上海瑞利化工气体有限公司。

1.2 仪器与设备

SY1200 超声仪 上海声源超声仪器设备有限公司; SP-756PC 型紫外-可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司; Spectrum 100 傅里叶变换红外光谱(FTIR)、Pyris 1 差示扫描量热仪(DSC、TGA7 热重分析仪(TGA) 美国 Perkin Elmer 公司; 超临界注入装置(图 2)。



1.二氧化碳钢瓶; 2、4、9、10. 阀门; 3.手动泵; 5.三通阀; 6.循环泵; 7.恒温水浴加热装置; 8.注入釜; 11.烧结板。

图2 超临界注入装置流程图

Fig.2 Flowchart of supercritical impregnation apparatus

1.3 方法

1.3.1 复合物的制备

将过量的 α -生育酚和 β -环糊精分别注入釜 8 的最底层和中层烧结板 11 上(图 2), 密封注入釜后, 打开阀门 2、4、9、10, 通入 CO_2 排出装置内的空气后, 关

闭阀门 10; 然后用手动泵 3 向体系中打入二氧化碳; 并用恒温水浴装置控制系统温度; 当系统达到预设的压力和温度时, 系统中的二氧化碳达到超临界状态, 关闭阀门 2、4, 打开阀门 9, 开启循环泵 6, 此时超临界二氧化碳在循环泵 6、注入釜 8 和阀门 9 组成的循环系统中循环。体系中的超临界二氧化碳透过底层的烧结板将 α -生育酚溶解并携带已溶解的 α -生育酚透过中层烧结板与 β -环糊精相互作用形成复合物。实验结束后, 关闭循环泵 6, 打开阀门 10, 缓慢泄压至常压后, 取出样品待分析。

1.3.2 复合物负载量的测定

α -生育酚在 292nm 波长处有很强的紫外吸收, 而 β -环糊精在此处没有吸收, 因此可以利用紫外-分光光度法测定并计算 α -生育酚/ β -环糊精复合物中负载的 α -生育酚的质量。

α -生育酚的乙醇溶液在 292nm 波长处的标准曲线回归方程为: $A=0.00653C-0.01116$, $R^2=0.9995$ 。

式中: A 为吸光度; C 为质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

将制得的复合物配成 2mg/mL 乙醇溶液, 测定复合物乙醇溶液的吸光度, 结合回归方程计算负载 α -生育酚的质量, 按下式计算 α -生育酚的负载量。

$$\alpha\text{-生育酚的负载量}/\% = \frac{\text{负载的}\alpha\text{-生育酚的质量}/\text{g}}{\alpha\text{-生育酚}/\beta\text{-环糊精复合物的质量}/\text{g}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 工艺参数对负载量的影响

2.1.1 温度对 α -生育酚负载量的影响

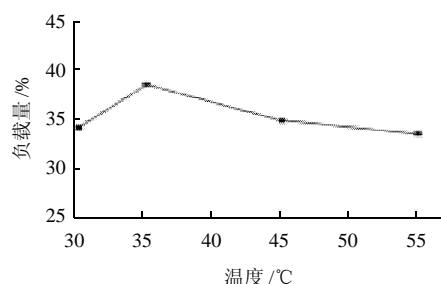


图3 温度对负载量的影响

Fig.3 Effect of temperature on loading capacity

温度对负载量的影响如图 3 所示, 当温度由 30°C 升高至 35°C 时, 二氧化碳从亚临界状态转变为超临界状态, 溶解能力增大, α -生育酚的负载量由 34.3% 增至 38.7%, 继续升高温度, 二氧化碳的密度下降, α -生育酚在二氧化碳中溶解度减小, 负载量下降, 当温度升至 55°C 时, α -生育酚负载量降至 33.7%。

2.1.2 压力对 α -生育酚负载量的影响

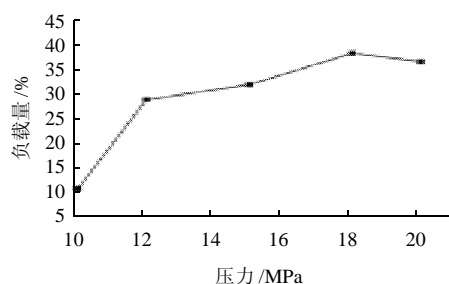


图4 压力对负载量的影响

Fig.4 Effect of pressure on loading capacity

如图4所示,当温度为35℃,超临界二氧化碳压力由10MPa上升到18MPa时,超临界二氧化碳的密度随压力的增大而增大, α -生育酚在超临界二氧化碳的溶解度也随着增大,另外超临界二氧化碳的渗透能力也随着压力的增加而提高,从而有更多的 α -生育酚可能被注入到 β -环糊精中,因此 α -生育酚负载量由11%增大至38.7%。但是当压力由18MPa继续升高到20MPa时, α -生育酚的负载量却由38.7%减小至38.2%,这可以从超临界二氧化碳注入过程的原理来分析和解释,随着压力的继续增大,超临界二氧化碳携带能力也进一步增强,导致超临界二氧化碳与 α -生育酚之间的作用力增强,当超临界二氧化碳与 α -生育酚之间的作用力大于 α -生育酚与环糊精之间的作用力时,此时会有更多的 α -生育酚溶解在超临界二氧化碳中,被超临界二氧化碳携带,从而使得沉积在环糊精上的 α -生育酚的量相对减少。

2.1.3 注入时间对 α -生育酚负载量的影响

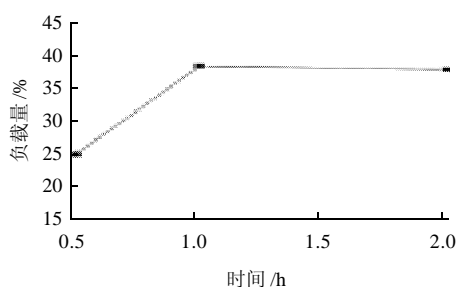


图5 注入时间对负载量的影响

Fig.5 Effect of impregnation time on loading capacity

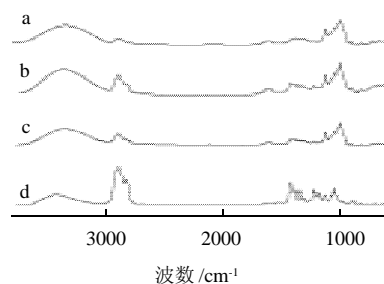
图5表明,在35℃、18MPa条件下,当注入时间由0.5h增加到1h时,负载量随着时间的增加而增大,时间继续增加, α -生育酚的负载量则不再增加。说明注入时间为1h时, α -生育酚在环糊精和超临界二氧化碳分配已达到平衡,负载量为38.7%。

2.2 复合物的结构表征

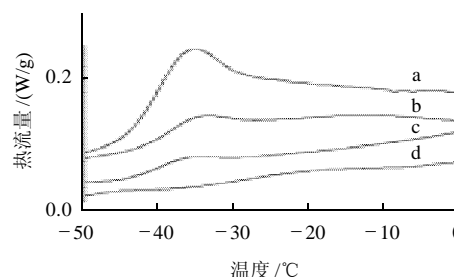
2.2.1 红外光谱分析

α -生育酚和 β -环糊精有不同的红外光谱特征峰,因此可以用红外光谱来研究复合物中 α -生育酚和 β -环糊精的存在形式。因为亚甲基的不对称伸缩振动和甲基

的对称伸缩振动, α -生育酚在2924 cm^{-1} 和2867 cm^{-1} 处有很强的红外吸收峰^[3]。对比图6b和图6c发现,物理混合物和复合物在此处都有吸收峰,但是物理混合物的峰强于复合物的峰,可能是因为部分 α -生育酚进入到环糊精的疏水空腔,从而导致吸收峰的减弱。另外,在1460 cm^{-1} 处,由生育酚的苯环骨架变形振动产生的吸收峰^[3],物理混合物强于复合物,可能是因部分生育酚的苯环进入到环糊精的空腔,抑制了苯环的变形振动,从而导致复合物在此处的吸收峰减弱。

图6 β -环糊精(a)、 α -生育酚和 β -环糊精物理混合物(b)、 α -生育酚/ β -环糊精复合物(c)、 α -生育酚(d)红外图谱Fig.6 IR spectra of β -cyclodextrin (a), physical mixture of α -tocopherol and β -cyclodextrin (b), α -tocopherol and β -cyclodextrin complex (c) and α -tocopherol (d)

2.2.2 差热分析

图7 α -生育酚(a)、 α -生育酚和 β -环糊精物理混合物(b)、 α -生育酚/ β -环糊精复合物(c)和 β -环糊精(d)的差热分析图Fig.7 DSC spectra of α -tocopherol (a), physical mixture of α -tocopherol and β -cyclodextrin (b), α -tocopherol and β -cyclodextrin complex (c), and β -cyclodextrin (d)

α -生育酚在-40℃左右会发生玻璃化转变^[13-14],因此,可以用差热分析法来分析复合物中 α -生育酚在 β -环糊精中的存在方式。由图7可知, α -生育酚和 β -环糊精物理混合物和复合物,均在-40℃处有一个吸热峰,说明物理混合物和复合物中均含有 α -生育酚,但是等量的两种物质在相同的测试条件下,复合物的吸热峰弱于混合物的吸热峰,说明有部分的生育酚包埋在环糊精中。

2.2.3 热重分析

β -环糊精分子腔体内外均含有少量的结晶水,并通过这些结晶水来维持其结构的稳定性^[15],通过研究环糊精中含水量的变化可以研究生育酚在环糊精中的存在

形式。 α -生育酚、 β -环糊精两者的物理混合物和复合物的热重分析如表1所示。表1结果表明,相同生育酚含量的复合物和混合物,复合物的含水量小于混合物,这可能是由于环糊精中的水分子被生育酚取代,从而导致含水量的下降。

表1 热重分析表
Table 1 TGA statements

样品	H ₂ O 质 量损失/%	第一阶段		第二阶段	
		分解温度/℃	质量损失/%	分解温度/℃	质量损失/%
α -生育酚	0.3	217.5	99.7		
β -环糊精	13.6	298.1	95.4		
α -生育酚和 β -环糊精物理混合物	10.5	203.7	23.6	298.7	61.3
α -生育酚/ β -环糊精复合物	9.2	216.4	29.9	305.5	54.8

2.3 α -生育酚/ β -环糊精复合物在水中的分散性

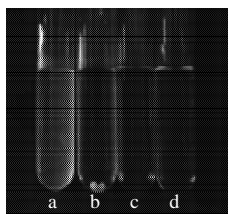


图8 β -环糊精(a)、 α -生育酚(b)、 α -生育酚和 β -环糊精物理混合物(c)、 α -生育酚/ β -环糊精复合物(d)在水中的分散图
Fig.8 Dispersion of β -cyclodextrin (a), α -tocopherol (b), physical mixture of β -tocopherol and α -cyclodextrin (c), α -tocopherol and β -cyclodextrin complex (d) in water

从表征结果可以发现, α -生育酚进入了 β -环糊精内腔中,形成了复合物,为进一步考察复合物是否可以溶解或分散在水中,比较了 β -环糊精、 α -生育酚以及 α -生育酚/ β -环糊精复合物在水中的溶解情况。取50mg等负载量的复合物和物理混合物、适量的生育酚、环糊精加到10mL水中,超声波分散1min后,4种样品在水中的溶解情况如图8所示,环糊精在水中溶解为澄清透明溶液(图8a),生育酚和物理混合物均不能在水中分散(图8b、c),而复合物能在水中均匀地分散(图8d),在水中的平均粒径为823nm,且在450~900nm间的强度分布最大,结果如图9所示。

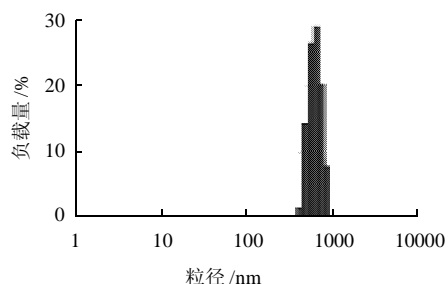


图9 α -生育酚/ β -环糊精复合物在水中的粒径分布图
Fig.9 Particle size distribution of α -tocopherol/ β -cyclodextrin complex in water

3 结论

采用超临界二氧化碳注入法制备 α -生育酚/ β -环糊精复合物,研究了温度、压力和时间对 α -生育酚负载量的影响。结果表明,当注入时间一定, α -生育酚的负载量随温度和压力的升高先增加后减少;当温度35℃、压力18MPa时、注入时间1h时,负载量最大为38.7%;结构表征结果表明,复合物中的生育酚与环糊精有很好的相互作用,因此,复合物在水中可以均匀地分散。超临界二氧化碳注入法制备 α -生育酚/ β -环糊精复合物,操作简单,无需后续处理,不影响被包埋物质的生物活性,是制药及食品工业中生物活性物质包埋的绿色新工艺。

参考文献:

- [1] 李军生, 黄位明, 秦国梅, 等. VE 酯衍生物稳定性及其在食品中的应用研究[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 29-33.
- [2] BARKER S, YUEN K, CRAIG D. An investigation into the low temperature thermal behavior of vitamin E preparation USP using differential scanning calorimetry and low frequency dielectric analysis[J]. J Pharm Pharmacol, 2000, 52(8): 941-947.
- [3] MAN Y, AMMAWATH W, MIRGHANI M. Determining α -tocopherol in refined bleached and deodorized palm olein by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. Food Chemistry, 2005, 90(1/2): 323-327.
- [4] SONG Y, LEE J, LEE H. α -tocopherol-loaded Ca-pectinate microcapsules: optimization, *in vitro* release and bioavailability[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2009, 73(2): 394-398.
- [5] 欧阳玉祝, 麻成金, 石爱华, 等. 维生素 E- β -环糊精包络物抗氧化及其动力学研究[J]. 食品科学, 2007, 28(4): 23-27.
- [6] MARTIN del VALLE E M. Cyclodextrins and their uses: a review[J]. Process Biochemistry, 2004, 39(9): 1033-1046.
- [7] MONTEGHI NI M, KIKI I C I, PERISSUTTI B, et al. Characterisation of nimesulide-beta-cyclodextrins systems prepared by supercritical fluid impregnation[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004, 58(3): 637-644.
- [8] KOONTZ J, MARCY J, O'KEEFE S, et al. Cyclodextrin inclusion complex formation and solid-state characterization of the natural antioxidants α -tocopherol and quercetin[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(4): 1162-1171.
- [9] BELHADJ-AHMED F, BADENS E, LLEWELLYN P, et al. Impregnation of vitamin E acetate on silica mesoporous phases using supercritical carbon dioxide[J]. J Supercritical Fluids, 2009, 51(2): 278-286.
- [10] PERRUT M, JUNG J, LEBOEUF F. Enhancement of dissolution rate of poorly soluble active ingredients by supercritical fluid processes: Part II: Preparation of composite particles[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2005, 288(1): 11-16.
- [11] SHEN Yinglin, YANG Shenghua, WU Longmin, et al. Study on structure and characterization of inclusion complex of gossypol/beta cyclodextrin[J]. Spectrochimica Acta Part A, 2005, 61(6): 1025-1028.
- [12] BANDI N, WEI W, ROBERTS C, et al. Preparation of budesonide and indomethacin hydroxypropyl-cyclodextrin (HPBCD) complexes using a single-step, organic-solvent-free supercritical fluid process[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004, 23(2): 159-168.
- [13] SZWAJCAZAK E, WIERGIEL J, STAGRACZYNSKI R, et al. Viscous and dielectric properties of α -tocopherol and α -tocopherol acetate[J]. Physics and Chemistry of Liquids, 2009, 47(4): 460-466.
- [14] KAMINSKI K, MASLANKA S, ZIOLO J, et al. Dielectric relaxation of α -tocopherol acetate (vitamin E)[J]. Physical Review E, 2007, 75(1): 1-7.
- [15] NAKAI Y, YAMAMOTO K, TERADA K. Properties of crystal water of α -, β -, and γ -cyclodextrin[J]. Chem Pharm Bull, 1986, 34(5): 2178-2182.