

根皮素蛋氨酸希夫碱的合成及其性质研究

万平红¹, 余燕影², 樊柏林³, 曹树稳^{1,2*}

¹南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047;

²南昌大学化学系, 南昌 330031; ³湖北省疾病预防控制中心, 武汉 430079

摘要: 本研究旨在提高根皮素的溶解性和抗氧化活性。以根皮素为母体, 在其结构上引入水溶性较好的蛋氨酸, 合成了一种新型的根皮素衍生物——根皮素蛋氨酸希夫碱。采用 UV、红外、¹H NMR 及 MS 对其结构进行了表征, 并对根皮素及其衍生物的溶解性、抗氧化活性和稳定性进行了探讨。实验结果表明, 与母体根皮素相比, 根皮素衍生物的水溶性提高了约 20 倍, 其抗氧化活性及在不同 pH 介质中的稳定性均优于根皮素。急性毒性实验的结果为小鼠 LD₅₀ > 5000 mg, 属实际无毒。因此, 在根皮素结构上引入蛋氨酸基团既提高其抗氧化性、溶解性和稳定性, 又保证其安全性, 为拓宽根皮素在食品和药品中的广泛应用提供新的途径。

关键词: 根皮素; 根皮素蛋氨酸希夫碱; 抗氧化活性; 溶解性; 稳定性; 急性毒性

中图分类号: R248.3

文献标识码: A

Synthesis and Property Study of Phloretin Methionine Schiff-base

WAN Ping-hong¹, YU Yan-ying², FAN Bo-lin³, CAO Shu-wen^{1,2*}

¹State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

²Department of Chemistry, Nanchang University, Nanchang 330031, China;

³Hubei Provincial Center for Disease Control Prevention, Wuhan 430079, China

Abstract: To improve the solubility and antioxidant ability of phloretin, water-soluble methionine was induced to the structure of phloretin, a novel Schiff-base was synthesized with phloretin and methionine. The targeted compound was characterized by UV, IR, ¹H NMR and MS, and their solubility and antioxidant ability were investigated. In addition, the stabilities of phloretin and phloretin methionine Schiff-base were discussed. The results showed the new phloretin derivative had better solubility and antioxidant ability than phloretin. Furthermore, the derivative was more stable in mediums with different pH values. The result of mice acute oral toxicity test showed the LD₅₀ of phloretin methionine Schiff-base were higher than 5000 mg, suggesting that the targeted compound maybe nontoxic. Therefore it was significant to induce methionine to the structure of phloretin, and to broaden the application of phloretin in food and drugs.

Key words: phloretin; phloretin methionine schiff-base; antioxidant ability; solubility; stability; acute toxicity

根皮素(Phloretin)是一种具二氢查耳酮结构的黄酮类化合物, 主要分布在苹果、梨等多汁水果的果皮及根皮中。国内外的研究表明, 根皮素具有明显生物活性, 如抗氧化^[1]、抗炎^[2]和抑制酪氨酸酶活性^[3]等。此外, 研究表明根皮素能显著地抑制食品体系中的美拉德反应, 提高食品质量^[4]。虽然根皮素已获美国 FDA 批准可作为食品添加剂^[5], 但是由于其溶解性较差, 一定程度上限制了其在食品和药品中的广泛应用。目前对根皮素的结构修饰研究主要集中在增强其生物活性, 如抗氧化性^[6]和抑制酪

氨酸酶活性^[7]。而针对根皮素水溶性和稳定性差, 进行结构修饰的报道却较少。因此, 在保证根皮素使用相对安全的前提下对根皮素进行结构修饰旨在提高其溶解性、稳定性和抗氧性的研究显得十分必要。

蛋氨酸又名甲硫氨酸, 味微甜, 易溶于水和 95% 的乙醇, 是一种人体必需氨基酸, 对人体具有重要意义, 如蛋氨酸及其代谢产物具有抗氧化能力^[8]。另外, 蛋氨酸的代谢产物, 如谷胱甘肽和谷光氨肽是重要的细胞抗氧化剂之一。氨基酸希夫碱具有多个氧和氮原子, 是一类重要的生物配体, 具有良好的抗菌^[9]、抗癌^[10]和抗氧化^[11]等生物活性而引起人们的极大关注。因此本实验选来自天然相

对安全的根皮素和蛋氨酸为原料,旨在合成一种溶解性、稳定性和抗氧化活性更佳且相对安全的新食品添加剂。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

根皮素(98%,陕西华泰精细化工),ABTS(日本东京化成);DPPH(Sigma);三羟甲基氨基甲烷(Sigma);甲硫氨酸、BHA、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、三氯化铁、EDTA、硫酸亚铁、邻菲罗啉、30%过氧化氢、过硫酸钾等均为国产分析纯;所用水均为二次蒸馏水。

UV-2450 紫外分光光度计(日本岛津公司);FTIR Nicolet5700 傅里叶变换红外光谱仪(美国热电尼高力公司);AV-600 型核磁共振仪(德国BRUKER公司);X-4 显微熔点测定仪(成都名驰仪器有限公司);DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司);DZF-150 数显小型恒温真空干燥箱(上海精宏实验设备公司);SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);Agilent 6538 高分辨四级杆-飞行时间质谱仪(Q-TOF-MS,安捷伦科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 根皮素蛋氨酸希夫碱的合成

称取 21 mmol L-蛋氨酸(3.134 g)和适量氢氧化钾,直至蛋氨酸在甲醇中全部溶解。称取根皮素 20 mmol(5.4854 g)溶于 10 mL 甲醇中,慢慢滴加到反应瓶中,滴加 2~3 滴冰乙酸作催化剂并调节反应液至中性,回流反应 18 h。合成路线如图 1 所示。反应液经 100~200 目硅胶柱层析分离纯化,TLC 跟踪检测,收集第二组分,蒸除溶剂后真空干燥至恒重,经 HPLC 归一法检测纯度为 94%。

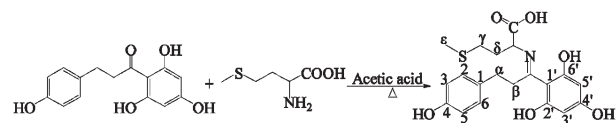


图 1 根皮素蛋氨酸希夫碱合成路线

Fig. 1 Synthetic route of phloretin methionine schiff-base

1.2.2 溶解性测试

参照文献^[12]的方法,用乙醇配制初始浓度为 0.020 mg/mL 的样品溶液,稀释为 5 个浓度梯度(0.004、0.008、0.012、0.016 和 0.020 mg/mL),分别在根皮素和根皮素蛋氨酸希夫碱的最大吸收波长

286 nm 和 330 nm 处绘制标准曲线。称取待测样品适量(确保待测样品过量,以达到饱和状态),加入到分别装有 10 mL 蒸馏水和正己烷的比色管中,37 °C 搅拌震荡 24 h,高速离心机 10000 rpm 离心 10 min,取上清液经 0.45 μm 的膜过滤,收集滤液稀释 10 倍,在最大吸收波长处测定其吸光值,每组做三次平行,根据标准曲线测定待测样品的溶解性。

1.2.3 抗氧化及清除自由基活性研究

1.2.3.1 总抗氧化能力测定(清除 ABTS 自由基)

参照 Re R^[13]的方法,反应体系略作修改。ABTS 储备液:将 7 mmol/L 的 ABTS 水溶液与 2.45 mmol/L 的 K₂S₂O₈ 溶液混合,室温暗处放置 12~16 h 后使用。ABTS 工作液:使用前将 ABTS 储备液用乙醇稀释,至 734 nm 处测其吸光度值为 0.70 ± 0.02 后方可使用。于比色管中依次加入不同浓度受试样品 0.5 mL 及 ABTS⁺工作液 5 mL,以乙醇溶液作为空白对照,室温避光反应 6 min 后于 734 nm 处测定吸光值。平行测定三次,结果为平均值 ± 标准偏差。

$$\text{ABTS}^+ \text{清除率}(\%) = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100$$

其中 A₁ 为未加样品,加入 ABTS⁺时的吸光度值;A₂ 为加入样品和 ABTS⁺时的吸光度值。

1.2.3.2 清除 DPPH 自由基

参照 Lee YL 等^[14]方法,反应体系略作修改为:比色管中依次加入不同浓度受试样品 1 mL 及 0.6 mmol/L DPPH 甲醇溶液 0.5 mL,然后以乙醇补充体积至 5 mL,30 min 室温避光反应后于 517 nm 处测定吸光值。平行测定三次,结果为平均值 ± 标准偏差。

$$\text{DPPH 清除率}(\%) = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100$$

其中, A₁ 为不加样品,加入 DPPH 时的吸光度值;A₂ 为加入样品和 DPPH 时的吸光度值。

1.2.3.3 清除羟基自由基

参照余燕影^[15]等方法,利用 Fenton 反应产生羟基自由基,反应体系:于 10 mL 比色管中依次加入邻菲罗啉(5 mmol/L)0.2 mL, Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH = 7.4)1.0 mL、FeSO₄(7.5 mmol/L)0.2 mL、EDTA(2.5 mmol/L)0.2 mL 或不同浓度受试样品,最后加入 0.2 mL H₂O₂(1%)启动反应,无水乙醇定容至 5 mL,37 °C 水浴反应 60 min,于 536 nm 处测定吸光值,平行测定三次,结果为平均值 ± 标准偏差。

$$\cdot\text{OH} \text{清除率}(\%) = [(A_b - A_c) / (A_a - A_c)] \times 100$$

其中, A_a 为不加 H_2O_2 和样品时的吸光度; A_b 为加入 H_2O_2 和样品时的吸光度; A_c 为加入 H_2O_2 , 但不加样品时的吸光度。

1.2.4 稳定性研究

环境的 pH 是影响黄酮类化合物稳定性的关键因素之一, 本实验通过测定根皮素及其蛋氨酸希夫碱的最大特征吸收峰处的吸光值来研究二者的稳定性。考查了不同 pH 值对其稳定性的影响, 重复 3 次实验。实验方法参考文献^[16]: 取一定量的样品分别溶解于 pH 值为 3、4、5、6、7、8、9 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液, 配置成浓度 0.04 mM 的溶液, 室温放置 12 h 后取样, 测定样品在最大吸收波长处的吸光度值。

1.2.5 急性毒性实验

本实验委托湖北省食品药品安全评价中心检测, 具体实验过程: 取体重 18 ~ 22 g 小鼠雌雄各 10 只, 雌雄各半。灌胃量按照 25 mL/kg · BW/次, 1 日 2 次, 间隔 6 h, 给药剂量为 5000 mg/kg · BW。灌胃前禁食 16 h, 灌胃后 3 h 后恢复进食。给予受试样品当天连续观察, 以后每天上、下午各观察动物一次, 共 14 d, 记录动物状况及死亡情况。对中毒死亡及濒死动物及时进行解剖, 试验结束后对未死动物采用颈椎脱臼法处死、解剖, 对有明显病变的脏器进行组织病理学检查, 试验开始和结束时称取动物体重。

2 结果与讨论

2.1 结构表征

表 1 根皮素及其蛋氨酸希夫碱红外光谱数据 (cm^{-1})

Table 1 Main IR data of phloretin and schiff-base (cm^{-1})

	$\nu C=O$	$\nu C=N$	$\nu Ar-O$	$\nu as(COO^-)$	$\nu s(COO^-)$
根皮素 Phloretin	1633.82	-	1208.85	-	-
希夫碱 Schiff base	-	1629.26	1254.48	1578.01	1414.64

根皮素蛋氨酸希夫碱 黄色粉末; mp. 77.0 ~ 79.6 °C; 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 12.79 (s, 1H, COOH), 12.23 (s, 2H, OH-2', 6'), 9.11 (s, 1H, OH-4'), 7.08 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3, 5), 6.88 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, OH-4), 6.66 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-2, 6), 5.59 (s, 2H, H-3', 5'), 4.01 (m, 1H, N-CH), 3.15 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, H- α), 2.75 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, H- β), 2.59 (m, 2H, H- γ), 2.05 (s, 3 H, H- ϵ), 1.95 (m, 2H, H- δ); HR-EI-MS m/z 406.1317 [$M + H$] $^+$ (calcd

2.1.1 UV 光谱

由图 2 可知, 根皮素在 225 nm、286 nm 处有两个强吸收峰, 分别归属于苯环的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁和羰基的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁。新希夫碱与母体相比, 最大吸收波长由 286 nm 处红移至 330 nm, 红移了 44 nm, 这可能是由于形成席夫碱后, 根皮素的 C=O 转变成 C=N, 且 -COOH 上的 H 与 N 原子形成分子内氢键, 使得氨基酸残基结构成环后延长了整个分子结构的共轭体系, 导致电子跃迁的能级能量差变小, 最大吸收峰向长波方向移动。

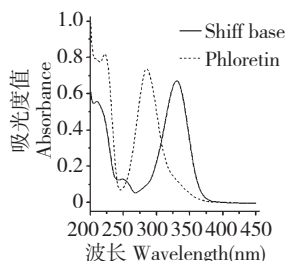


图 2 根皮素及其蛋氨酸希夫碱紫外-可见光谱

Fig. 2 UV-Vis spectrum of phloretin and methionine schiff-base

2.1.2 IR 光谱

用 KBr 压片, 测定根皮素及其蛋氨酸希夫碱的红外特征吸收峰, 测量范围 400 ~ 4000 cm^{-1} , 数据见表 2。根皮素的羰基振动频率 $\nu(C=O)$ 位于 1633.82 cm^{-1} , 形成希夫碱后在 1629 cm^{-1} 出现了 C=N 特征吸收, 且在 1578.01 cm^{-1} 和 1414.64 cm^{-1} 分别出现了 $\nu as(COO^-)$ 和 $\nu s(COO^-)$ 的振动峰。

for [$C_{20}H_{24}NO_6S$] $^+$, 406.1324)。

2.2 溶解性测试

实验在相同条件下分别测定了根皮素及其氨基酸希夫碱的水溶性和脂溶性。实验结果表明, 经氨基酸修饰后的产物, 水溶性较根皮素母体提高了约 20 倍, 可能是由于亲水性羧基的贡献, 加上与羧基相连的 α -C 是 sp^3 杂化, 削弱了结构的平面性, 有利于水分子的插入。修饰物的脂溶性只是略有改善。

表 2 根皮素及其蛋氨酸希夫碱的标准曲线和溶解性

Table 2 The standard curve and solubility of phloretin and methionine Schiff-base

化合物 Compound	标准曲线 Standard curve	<i>r</i>	水溶性 Water solubility (mg/L)	脂溶性 Lipid solubility (mg/L)
根皮素 Phloretin	$Y=0.07344X-0.03043$	0.9994	28.87 ± 0.06	15.52 ± 0.08
希夫碱 Schiff-base	$Y=0.07699X+0.0373$	0.9997	506.41 ± 1.15	23.47 ± 0.11

2.3 抗氧化活性研究

根皮素及其蛋氨酸希夫碱清除三种自由基的 IC_{50} 值如表 3 所示,根皮素及其蛋氨酸希夫碱清除 $ABTS^+$ 和 $\cdot OH$ 自由基的能力强于常用的食品添加剂 BHA,而相较于根皮素母体,根皮素蛋氨酸希夫碱的清除三种自由基的能力均有所增强。抗氧化剂

能使自由基失活主要基于两种机制:氢质子转移(HAT)和电子转移(ET)^[17]。根皮素蛋氨酸希夫碱清除自由基能力强于根皮素可能是由于结构中的-COOH 可提供质子,同时含有给电子的 S 原子,从而增强了使自由基转变为稳定分子态的能力,即增强了其清除自由基能力。

表 3 根皮素及其蛋氨酸希夫碱清除自由基能力

Table 3 The radical-scavenging activity of phloretin and methionine Schiff-base

化合物 Compound	半抑制浓度 IC_{50} (μM)		
	$ABTS^+$	DPPH	$\cdot OH$
根皮素 Phloretin	4.91 ± 0.12	222.14 ± 0.18	284.90 ± 1.12
希夫碱 Schiff base	1.78 ± 0.08	175.47 ± 0.23	258.72 ± 0.35
BHA	10.72 ± 0.10	32.45 ± 0.11	>1000

2.4 稳定性研究

图 3 为 pH 值对根皮素及其修饰物的稳定性影响,可见环境 pH 值改变对根皮素修饰物影响较小,而对根皮素的影响较大。在 $pH < 5$ 时,根皮素最大吸收峰处的吸光度值随 pH 值减小而增大;当 pH 为 5~6 时吸光度值基本不变,当 $pH > 6$ 时,吸收值随 pH 增大而减小,当 $pH = 9$ 时,根皮素吸光度值仅为原值的 39%。此外,根皮素最大吸收峰也随着溶液 pH 增大出现峰红移(如图 4 所示),并开始出现一个新的吸收峰,并随 pH 增大新吸收峰的吸光度增大,且久置后溶液颜色加深,可能是在碱性条件下根

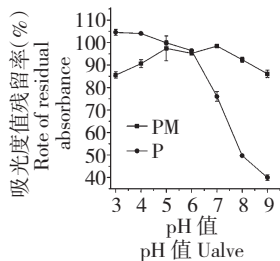


图 3 根皮素及其氨基酸希夫碱在不同 pH 值介质中吸光度值的残留率

Fig. 3 The rate of residual absorbance of phloretin and methionine Schiff-base in the mediums with different pH values

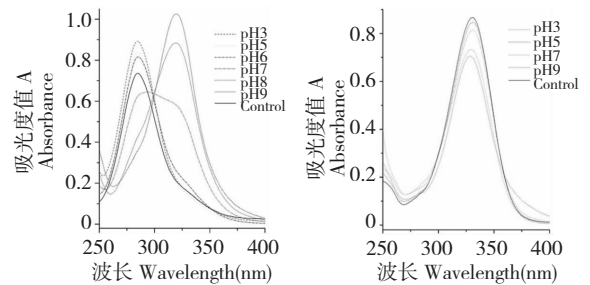


图 4 根皮素(左)及其氨基酸希夫碱(右)不同 pH 值介质中的紫外吸收光谱

Fig. 4 UV-Vis spectra of phloretin (left) and methionine schiff-base (right) in the mediums with different pH values

皮素的羟基较敏感,发生了自氧化作用。结果表明根皮素在 pH 为 5~6 时较稳定,在碱性条件下易被氧化。根皮素蛋氨酸希夫碱在测试 pH 范围内均较稳定,吸光度值的变化率仅为 1.4%~14.36%,且紫外吸收光谱图基本不变,推断可能是结构中的-COOH 的质子较苯环上的羟基的 H 质子更活泼,在碱性环境中起到了一定的缓冲作用,从而减弱了自氧化作用。由此提示在根皮素结构中引入羧基有利

于提高根皮素的稳定性。

2.5 急性毒性实验

灌胃当天雌雄小鼠出现精神萎靡症状,部分动物出现腹式呼吸,第二天恢复正常,雄性小鼠有3只在灌胃当天出现死亡,雌性小鼠无死亡。药后及停药观察期间,各组小鼠进食、饮水均正常,体重呈增长趋势,与空白对照组比较无显著性差异($P > 0$ 。

表4 根皮素蛋氨酸希夫碱小鼠急性经口毒性试验结果

Table 4 Acute oral toxicity testing results of phloretin methionine schiff-base on mice

组别 Groups	性别 Gender	剂量 Dose (mg/kg · BW)	动物数 Animal number (n)	动物体重变化(g) Weight changes		死亡动物数 Death number (n)	半致死量 LD ₅₀ (mg/kg · BW)
				初重 Initial weight	终重 Final weight		
对照 Control	雌	0	10	19.5 ± 1.1	29.8 ± 3.2	0	
样品 Sample	雌	5000	10	18.7 ± 0.6	27.1 ± 3.2	0	> 5000
对照 Control	雄	0	10	18.9 ± 0.6	34.1 ± 3.6	0	
样品 Sample	雄	5000	10	19.2 ± 0.9	29.0 ± 4.8	3	> 5000

3 结论

根皮素经蛋氨酸结构修饰后得到的修饰物—根皮素蛋氨酸希夫碱,其水溶性有了较好的提高,且抗氧化活性也都得到改善。另外根皮素蛋氨酸希夫碱在不同 pH 介质环境,尤其是碱性环境中的稳定性显著优于母体根皮素。急性毒性实验的结果表明根皮素希夫碱具有较好的安全性,根皮素蛋氨酸希夫碱有望开发成为一种新型食品添加剂。

参考文献

- Vasanth RH, Yasmin A. Inhibition of oxidation of aqueous emulsions of omega-3 fatty acids and fish oil by phloretin and phloridzin. *Molecules*, 2010, 15: 251-257.
- Lu XY(陆晓宇), Zeng YY(曾耀英), Ye YX(叶燕霞), et al. Anti-inflammatory and immunosuppressive effect of phloretin. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2009, 44: 480-485.
- Lin YP, Hsu FL, Chen CS, et al. Constituents from the Formosan apple reduce tyrosinase activity in human epidermal melanocytes. *Phytochemistry*, 2007, 68: 1189-1199.
- Ma J, Peng X, Ng KM, et al. Impact of phloretin and phloridzin on the formation of Maillard reaction products in aqueous models composed of glucose and l-lysine or its derivatives. *Food Function*, 2012, 3: 178-186.
- Wieland M, Fussenegger M. Reprogrammed cell delivery for personalized medicine. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64: 1477-

1487. 05), 详见表4。各组小鼠外观特征基本正常,毛发生色泽正常,肤颜色粉红正常,耳、眼、口、鼻未见异样分泌物,呼吸道反应正常,未见咳嗽、哮喘及喷嚏现象,四肢活动、步态正常,小鼠解剖未发现病变脏器。试验结果为根皮素蛋氨酸希夫碱小鼠急性经口 LD₅₀ > 5000 mg/kg · BW, 根据《食品安全性毒理学评价程序和方法》毒性分级,属实际无毒。

1487.

- Jing L(李静), Yu YY(余燕影), Cao SW(曹树稳). Synthesis, characterization, and antioxidant activity of phloretin isonicotinyl hydrazone. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2011, 23: 824-827.
- Xu B, Yu Y, Wan PH, et al. Synthesis and antityrosinase, antioxidant activities of phloretin thiosemicarbazones. *Res Chem Intermed*, 2013, 10: 1-13.
- Stadtman ER, Moskovitz J, Berlett BS, et al. Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism. *Mole Cell Biochem*, 2002, 234: 3-9.
- Sakiyan I, Logoglu E, Arslan S, et al. Antimicrobial activities of N-(2-hydroxy-1-naphthalidene)-amino acid (glycine, alanine, phenylalanine, histidine, tryptophane) Schiff bases and their manganese(III) complexes. *Biometals*, 2004, 17: 115-120.
- Elsherif AA, Eldebss T. Synthesis, spectral characterization, solution equilibrium, in vitro antibacterial and cytotoxic activities of Cu(II), Ni(II), Mn(II), Co(II) and Zn(II) complexes with Schiff base derived from 5-bromosalicylaldehyde and 2-aminomethylthiophene. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2011, 79: 1803-1814.
- Qiao YH(乔艳红), Sun M(孙命). O-vanillin - an amino acid complexes of Schiff base and its inhibitory effect on O²⁻. *Chem Res Appl*(化学研究与应用), 2003, 15: 583-584.
- Bai TC, Yan GB, et al. Solubility of silybin in aqueous poly (ethylene glycol) solution. *Int J Pharm*, 2006, 308: 100-106.

(下转第1985页)