

宋佳璇, 韩晨瑞, 王雨贝, 等. 基于 β -环糊精基金属有机框架构建 4-萜烯醇包封体系 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(18): 88–94. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100247

SONG Jiakuan, HAN Chenrui, WANG Yubei, et al. Construction of Terpinen-4-ol Encapsulation System Based on β -Cyclodextrin-based Metal-organic Framework[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(18): 88–94. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100247

· 研究与探讨 ·

基于 β -环糊精基金属有机框架构建 4-萜烯醇包封体系

宋佳璇, 韩晨瑞, 王雨贝, 曹建康*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 为了改善 4-萜烯醇的疏水性和高挥发性, 延长其作用时间, 本研究通过改良蒸汽扩散法制备了 β -环糊精基金属有机框架 (β -cyclodextrin-based metal-organic framework, β -CD-MOF), 采用溶剂孵化法制备了 4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物, 并以 β -CD 为对照探究了二者的最佳包封比例。进一步分析了 4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物的形貌结构特性、光谱吸收特性和热重表征, 利用体外抑菌实验测定了该包合物对三种食源性病原菌的抑制作用。结果表明, 当 4-萜烯醇与 β -CD-MOF 的质量比为 1:1 时, 载药量和包封率最高, 且优于相同制备条件下以 β -CD 为载体时的效果。扫描电镜观察表明, 排列不规则的 β -CD 分子在 K^+ 的桥连作用下相互堆叠形成排列整齐的长方体 β -CD-MOF。傅里叶红外光谱和 X 射线衍射分析表明, 4-萜烯醇成功封装在 β -CD-MOF 中且二者之间存在氢键相互作用。热重分析表明, 利用 β -CD-MOF 包封可以延缓 4-萜烯醇的挥发速率, 将 4-萜烯醇应用的温度范围从 30~160 $^{\circ}C$ 扩大到 30~350 $^{\circ}C$ 。体外抑菌实验表明, 4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌三种冷链微生物均具有长效抑菌能力。综上所述, 将 4-萜烯醇封装在 β -CD-MOF 中可以实现有效保存, 本研究为绿色安全的新型冷链抑菌材料的开发提供了理论依据。

关键词: β -CD-MOF, 4-萜烯醇, 包封, 表征, 稳定性, 抑菌活性

中图分类号: TS255.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)18-0088-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100247



本文网刊:

Construction of Terpinen-4-ol Encapsulation System Based on β -Cyclodextrin-based Metal-organic Framework

SONG Jiakuan, HAN Chenrui, WANG Yubei, CAO Jiankang*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: In order to improve the hydrophobicity and volatility of terpinen-4-ol and extend its duration of action, β -cyclodextrin-based metal-organic framework (β -CD-MOF) was first prepared by the modified vapor diffusion method, and then terpinen-4-ol was encapsulated with the β -CD-MOF to prepare a terpinen-4-ol/ β -CD-MOF inclusion complex by the solvent incubation method. The mass ratio of the prepared β -CD-MOF or β -CD used as the control to terpinen-4-ol was optimized for encapsulation. The morphological characteristics, spectral absorption properties and thermogravimetric characterisation of the terpinen-4-ol/ β -CD-MOF complex were analyzed. Through *in vitro* bacteriostatic assays, the inhibitory effects of the complex on three food-borne pathogens were determined. The results showed that the highest drug loading and encapsulation efficiency were achieved when the mass ratio of terpinen-4-ol to β -CD-MOF was 1:1, superior to the same preparation conditions using β -CD as a carrier. Scanning electron microscope (SEM) observations indicated that irregularly arranged β -CD molecules stacked together under the bridging action of K^+ , forming an orderly arranged rectangular β -CD-MOF. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction (XRD) analysis

收稿日期: 2023-11-01

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFF1100904); 中国农业大学省校合作项目 (201904710611628)。

作者简介: 宋佳璇 (2001-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: 15806461988@163.com。

* 通信作者: 曹建康 (1976-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程, E-mail: cjk@cau.edu.cn。

demonstrated terpinen-4-ol was successfully encapsulated in β -CD-MOF with hydrogen bond interactions between them. Thermogravimetric analysis (TGA) proved that the volatilization rate of terpinen-4-ol could be retarded when encapsulated by β -CD-MOF, extending its application temperature range from 30~160 °C to 30~350 °C. *In vitro* antibacterial experiments showed that the terpinen-4-ol/ β -CD-MOF complex exhibited long-lasting antibacterial abilities against three common cold-chain microorganisms, including *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. In conclusion, encapsulating terpinen-4-ol in β -CD-MOF allows for effective preservation, providing a theoretical basis for the development of novel, green and safe antimicrobial materials for cold-chain applications.

Key words: β -CD-MOF; terpinen-4-ol; encapsulation; characterization; stability; antibacterial activity

在冷链运输过程中, 生鲜食品始终存在受食源性病原微生物污染的风险, 常见的冷链微生物污染者主要有大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、沙门氏菌等。随着生活水平的提高, 消费者更加注重食品的安全性, 绿色安全的低温抗菌材料拥有广阔的发展潜能, 逐渐成为研究的热点^[1]。因此, 本研究旨在开发一种绿色安全的新型冷链抑菌材料, 有效缓解生鲜食品的腐败变质, 保留食品原有风味并延长贮存期。

4-萜烯醇(terpinen-4-ol, $C_{10}H_{18}O$), 又名萜品烯-4-醇、松油烯-4-醇, 化学名 4-甲基-1-(1-甲基乙基)-3-环己烯-1-醇, 是茶树精油的主要活性成分, 占比 30% 以上, 具有强大的抗菌和抗炎特性^[2-4], 对金黄色葡萄球菌^[5]、蜡样芽胞杆菌^[6] 等细菌以及白色念珠菌^[7]、红色毛癣菌^[8] 等真菌的生长皆有良好的抑制作用。GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》中规定了 4-萜烯醇的主要来源茶树油(又名互叶白千层油)为允许使用的食品用天然香料, 然而它的疏水性和高挥发特性限制了其应用。降低 4-萜烯醇的挥发速度, 提高其稳定性成为其在食品工业应用中需解决的首要问题。利用多孔材料将 4-萜烯醇分子封装在空腔内, 可以提高 4-萜烯醇的稳定性, 改变气体分子的释放行为。

金属有机框架(Metal organic framework, MOF)是一种由金属离子与非食品级有机配体配位而成的多孔结晶材料, 由于合成组分(金属离子和有机配体)具备一定的毒性, 在食品工业应用中受到极大的限制^[9]。而使用生物相容性金属离子和有机配体连接物生产的绿色无毒的环糊精基金属有机框架(Cyclodextrin-based metal-organic framework, CD-MOF)的出现突破了这一限制^[10], 已成为当前食品领域的研究热点。最典型的 CD-MOF 材料于 2010 年被首次报道, 随着 γ -CD-MOF 合成技术的不断完善^[11], 基于其他碱金属离子(如 Na^+ , Rb^+ , Cs^+)以及 α -CD, β -CD 的 MOF 材料也相继得到了发展^[12], 已经在负载各种生物活性分子及控释方面展现出巨大的潜力^[13-15]。

目前, 对于 4-萜烯醇的研究大多集中于生物制剂和生物杀虫剂的制备方面, 关于其包封的内容相对较少, 且已有研究的包封效果存在复合物稳定性差、负载水平低、包封条件苛刻等局限性。 β -CD-MOF 结合了 β -CD 和 MOF 材料的优点, 其三维网状、高

孔隙率和大比表面积的结构具备强包合能力和高负载能力, 且不产生有毒试剂残留, 有望成为高效附载 4-萜烯醇的新载体^[16]。本研究将 4-萜烯醇封装在 β -CD-MOF 中以实现有效保存, 旨在为绿色安全的新型冷链抑菌材料的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大肠杆菌(*Escherichia coli*, ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538)、单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, ATCC 19115)

均购自北京保藏生物科技有限公司, 试管斜面 4 °C 保存; 牛肉膏蛋白胨(BPM)液体培养基: 称取 5.0 g 胰蛋白胨, 3.0 g 牛肉浸取物, 5.0 g 氯化钠, 1000 mL 蒸馏水, 滴加 5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 为 7.0, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 冷却后保存备用; 牛肉膏蛋白胨(BPM)固体培养基: 与上述配制过程相同, 灭菌前加入 15.0 g 琼脂, 高压蒸汽灭菌后, 趁热倒平板, 冷却凝固后于 4 °C 条件保存备用; β -环糊精(分析纯)、4-萜烯醇(纯度 98%)、十六烷基三甲基溴化铵(Cetyltrimethylammonium Bromide, CTAB)(分析纯) 均购自上海麦克林生化科技有限公司。

SN-HD-850 超净工作台 北京玖蓝科技有限公司; ZY-75MA 立式高压蒸汽灭菌锅 上海力辰科技有限公司; SU-8020 扫描电子显微镜 日本日立公司; IS-10 傅里叶红外光谱仪 美国尼高力公司; D8 X 射线衍射分析仪 深圳科时达电子科技有限公司; STA-449-F3 热重-差热分析仪 上海斯迈欧分析仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 β -CD-MOF 的制备 制备过程参考刘娟^[17] 报道的实验方法, 并做出适当的修改。

结晶过程: 称取 2.8352 g β -环糊精和 1.1236 g 氢氧化钾(物质的量比为 1:8), 溶于 60 mL 去离子水和 20 mL 乙醇中, 混合, 超声处理 30 min, 溶解均匀。通过 0.45 μ m 的聚四氟乙烯膜抽滤溶液以除去尺寸较大的颗粒。将抽滤后的溶液移入含有 200 mL 甲醇的烧杯中, 用保鲜膜包装密封, 置于 40 °C 恒温水浴中反应 6 h。然后, 向混合溶液中依次加入 800 mg CTAB 和 100 mL 甲醇溶液, 室温下过夜结晶。在 7000 \times g、20 °C 条件下离心 10 min, 收集沉淀。用异

丙醇溶液洗涤除去沉淀中过量的 CTAB 晶体,经 4 °C 低温干燥后得到纳米尺寸的 β -CD-MOF^[18]。

活化过程:为了除去 β -CD-MOF 晶体孔道内残留的高沸点溶剂(主要是氢氧化钾溶液)及水分,用二氯甲烷溶液浸泡晶体,置于摇床上振荡 3 d,每隔 24 h 更换一次溶液。在 7000×g、20 °C 条件下离心 10 min 收集晶体,45 °C 下真空干燥 12 h,干燥后的样品研磨备用。

1.2.2 4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物的制备 包封过程参考 KANG 等^[10]报道的实验方法,设置 4-萜烯醇与 β -CD-MOF 的质量比为 3:1、2:1、1:1、1:2 和 1:3,探究二者的最佳质量比。将 4-萜烯醇加入无水乙醇中,完全溶解,将 200 mg β -CD-MOF 分散于 100 mg/mL 对应体积的 4-萜烯醇乙醇溶液中,在 50 °C 下以 300 r/min 速度水浴振荡 3 h。在 4 °C 下冷却 24 h 后离心,去除上清液后用无水乙醇洗涤以去除未结合的 4-萜烯醇,然后过滤并在 60 °C 下真空干燥 4 h,得到 4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物。

1.2.3 4-萜烯醇/ β -CD 包合物的制备 为在同等条件下比较 β -CD-MOF 与 β -CD 的载药量和包封率,4-萜烯醇/ β -CD 包合物的制备过程参考上述 1.2.2,设置 4-萜烯醇与 β -CD 的质量比为 1:1,用 100 mg/mL 4-萜烯醇乙醇溶液完全溶解 200 mg β -CD,在 50 °C 下以 300 r/min 速度水浴振荡 3 h。在 4 °C 下冷却 24 h 后离心,去除上清液后用无水乙醇洗涤以去除未结合的 4-萜烯醇,然后过滤并在 60 °C 下真空干燥 4 h,得到 4-萜烯醇/ β -CD 包合物。

1.2.4 4-萜烯醇包封率的测定 测定方法参考 YANG 等^[19]的文献报道,在 25 °C 下,以无水乙醇为参比,测定了不同浓度的 4-萜烯醇(5、9、13、17、21、25 mmol/L)在 233 nm 处的吸光度,绘制了标准曲线 $y=0.0381x+0.0035$, $R^2=0.9995$ 。将 100 mg 干燥后的包合物加入到 10 mL 无水乙醇中。将混合溶液超声处理 30 min,使 4-萜烯醇完全从包合物中提取出来。通过离心分离进一步去除不溶物。最后,测定上清液溶液的吸光度,利用标准曲线计算相应浓度。每个样品重复 3 次,分别按公式(1)、公式(2)计算复合物的载药量和包封率。

$$\text{载药量}(\%) = \frac{\text{包合物中4-萜烯醇的质量}}{\text{包合物的质量}} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

$$\text{包封率}(\%) = \frac{\text{包合物中4-萜烯醇的质量}}{\text{初始4-萜烯醇的质量}} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

1.2.5 表征方法

1.2.5.1 扫描电镜分析 采用扫描电镜(Scanning electron microscope, SEM)对制备的 β -CD-MOF 和天然 β -CD 的晶体形貌进行测定。在样品台上用导电双面胶固定晶体样品,取一片晶体样品平铺使其形

成较薄的一层,真空喷金处理后,将样品放置于扫描电镜中,在合适的放大倍数下拍摄相片。

1.2.5.2 傅里叶红外光谱分析 采用傅里叶变换红外光谱仪(Fourier transform infrared spectrometer, FTIR)对制备的 4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物、4-萜烯醇/ β -CD 包合物以及相应的壁材 β -CD-MOF、 β -CD 进行红外光谱分析。采用溴化钾压片法,将 2 mg 样品与溴化钾(约 200 mg)一起研磨成细粉进行压片处理,以纯溴化钾为背景,在 4000~400 cm^{-1} 扫描范围内进行红外光谱扫描,分辨率为 4 cm^{-1} ,累计扫描 64 次。

1.2.5.3 X 射线衍射分析 对制备的 4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物、4-萜烯醇/ β -CD 包合物以及相应的壁材 β -CD-MOF、 β -CD 进行广角 X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)对比测定,实验选取的衍射条件为:铜靶, $\text{CuK}\alpha$ 辐射,管电流 40 mA,管电压 40 kV,衍射角度范围 $2\theta=5^\circ\sim 50^\circ$,步长为 0.02° ,扫描速度 $5^\circ/\text{min}$ 。

1.2.5.4 热重分析 对 4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物、4-萜烯醇/ β -CD 包合物、 β -CD-MOF、 β -CD 以及游离态的 4-萜烯醇的热稳定性进行热重分析(Thermogravimetric analysis, TGA),分析得到的热重曲线和微商热重曲线。实验参数设置为:氮气/空气流动环境,温度上升速率为 $10^\circ\text{C}/\text{min}$,温度上升范围为 $30\sim 600^\circ\text{C}$ 。

1.2.6 4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物的抑菌活性 抑菌试验参考潘晓丹^[20]报道的研究方法,采用牛津杯法测量包合物的抑菌环直径,确定 4-萜烯醇包合物 48 h 内对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的抑菌活性。将适量菌种接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中,37 °C 条件下摇床 200 r/min 活化培育 24 h,用紫外分光光度计测定菌悬液在 600 nm 处的吸光值(OD_{600}),控制 OD_{600} 值小于 1。吸取 100 μL 菌液与等量无菌生理盐水,加入到 100 mL 牛肉膏蛋白胨固体培养基中,涂布均匀制成平板。在制好的平板表面垂直放入牛津杯($\varphi=8$ mm),取 15 mg 4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物,用 100 μL 无菌生理盐水溶解,超声 30 min 分散后,分别加至牛津杯孔内,使用等量的 β -CD-MOF 作为对照组,等量无菌生理盐水作为空白组。放入 37 °C 恒温培养箱内培育 48 h,每隔 12 h 使用直尺测量各组样品抑菌环直径(mm)。

$$\text{抑菌环直径}(\text{mm}) = \text{抑菌圈直径} - \text{样品直径}$$

1.3 数据处理

本研究各项实验均重复 3 次。数据分析使用 SPSS 26.0 软件,设置显著性水平为 $P<0.05$,最终结果以平均值 \pm 标准差的形式表示,各图谱用 Origin 9.1 进行绘制。

2 结果与分析

2.1 4-萜烯醇与 β -CD-MOF 质量比对 4-萜烯醇载药量和包封率的影响

测定不同质量比样品液的吸光度, 利用标准曲线计算 4-萜烯醇浓度、载药量和包封率。由图 1 可得, 随着 4-萜烯醇与 β -CD-MOF 质量比的变化, 样品的载药量和包封率呈先升高后降低的趋势, 在质量比 1:1 时, 达到较高水平。当质量比小于 1:1 时, 随着 β -CD-MOF 浓度的升高, 更多的 4-萜烯醇分子被活化, 分子间的有效碰撞增多。当质量比大于 1:1 时, 过量的 4-萜烯醇分子使 β -CD-MOF 的捕获能力处于极限, 无法得到充分活化, 因此负载水平较低^[21-23]。当 4-萜烯醇与 β -CD-MOF 的质量比为 1:1 时, 包合物的载药量和包封率可达 21.15% 和 26.58%, 远高于其他质量比, 且比同等条件下的 4-萜烯醇/ β -CD 的载药量(20.38%)和包封率(23.19%)分别高出 0.77% 和 3.39%。

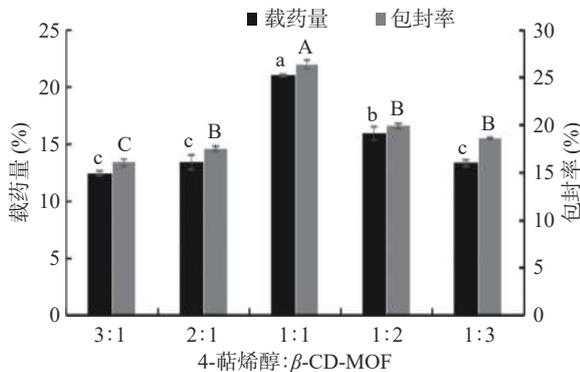


图 1 4-萜烯醇与 β -CD-MOF 的质量比对 4-萜烯醇载药量和包封率的影响

Fig.1 Effect of mass ratio of terpinen-4-ol to β -CD-MOF on the drug capacity and encapsulation rate of terpinen-4-ol
注: 在 $P < 0.05$ 水平下, a, b, c 和 A, B, C 表示样本间有显著差异。

与 HU 等^[9]采用 β -CD-MOF 包封薄荷醇的结果相比, 本实验 4-萜烯醇的载药量和包封率均偏低, 由此推断, 相较于薄荷醇分子, β -CD-MOF 对 4-萜烯醇分子的捕获能力偏弱, 该作用力的大小取决于芯壁材之间空腔结构和内表面积结构的匹配程度。与 YANG 等^[19]采用 β -CD 和 YU 等^[24]采用 γ -CD-MOF 封装 4-萜烯醇的结果相比, 本实验所得载药量偏高, 而包封率偏低。从载体制备和包封过程两方面分析: 首先, 在 β -CD-MOF 制备过程中, 反应时间、温度、 β -CD 添加量、 β -CD 与 KOH 的摩尔比、溶剂种类、表面活性剂 CTAB 的浓度等条件的选择会影响晶体的形态与尺寸, 进而影响了 4-萜烯醇的载药量和包封率。其次, 在 4-萜烯醇包封过程中, 添加的初始 4-萜烯醇浓度过高, 导致 β -CD-MOF 无法充分包封, 以致于出现高载药量低包封率的现象。综上, 尽管本实验的包封率有待通过优化试验条件来提高, 但包合物载药量的增加表明 β -CD-MOF 与 4-萜烯醇间的分子特性是相匹配的。

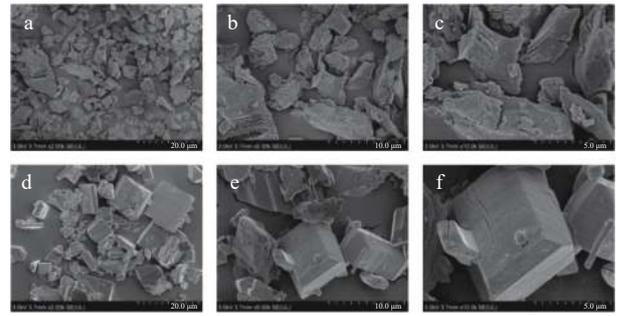


图 2 β -CD(a, b, c)和 β -CD-MOF(d, e, f)的 SEM 图像
Fig.2 SEM images of β -CD (a,b,c) and β -CD-MOF (d,e,f)
注: a, d(20 μ m); b, e(10 μ m); c, f(5 μ m)。

2.2 4-萜烯醇包合物的表征

2.2.1 晶体形貌分析 采用扫描电镜测定天然 β -CD 与 β -CD-MOF 的晶体形貌特征, 如图 2 所示。

天然 β -CD 的颗粒形状和大小均不规则, 排列松散不整齐, 破碎较多。与之相比, β -CD-MOF 的颗粒更小且大小均一, 形貌结构也相对整齐规则, 晶体排列有序, 呈现出长方体形状。此现象与 β -CD-MOF 的合成机理有关, 当 β -CD 分子处于碱性溶液体系时, 在静电作用下, -OH 基团中的质子 H^+ 丢失, 暴露出 O^- , 此时邻 C 上的 O 与之结合形成一个 $-OCCO^-$ 基团, 该基团能与 K^+ 配位, 因此 β -CD 分子在 K^+ 的桥连作用下能够相互堆叠, 不断延展, 从而形成排列整齐规则, 疏松多孔的 β -CD-MOF。根据 WANG 等^[25]和 BLIGHT 等^[26]的研究报道, β -CD-MOF 的平面晶体结构呈现整齐透明的矩形, 立体结构为无色的长方体晶体, 形成单斜 $P2_1$ 空间群, β -CD 单元排列形成平行的一维纳米管, CD 环面的主次面再以头对头/尾对尾的排列方式组装, 每个界面通过几个互补的氢键稳定, 本实验的 SEM 图像形貌特征与报道一致。

2.2.2 傅里叶红外光谱分析 红外光谱常被用来鉴定复合物是否形成, 通过对比复合物、主体及客体的红外光谱图的异同, 分析特征吸收峰位置和强度的变化从而推测主客体间是否复合成功。对 β -CD、 β -CD-MOF、4-萜烯醇/ β -CD 包合物、4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物的红外光谱进行了分析。结果表明, β -CD 和 β -CD-MOF 的 FTIR 谱均存在以下吸收带: 3420 cm^{-1} (-OH 拉伸振动); 2950 cm^{-1} (-CH₂); 1670 cm^{-1} (-OH 弯曲); 1030 cm^{-1} (C-O-C), 与已有研究结果相符^[27]。

由已有研究结论可知, 4-萜烯醇的傅里叶变换红外光谱的特征峰为: 3430 cm^{-1} (-OH); 2960 , 2820 cm^{-1} (-CH₂); 1430 cm^{-1} (-C-OH)^[19]。图 3 中显示了两种 4-萜烯醇包合物的红外光谱, 与母体材料相似, 在 $3700\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ 处均出现一个较宽的吸收峰, 该特征峰是由 -OH 基团伸缩振动产生的^[28]。相关研究报道, -OH 基团波段向波数更小的方向移动越多, 表明分子间的氢键相互作用力越强^[29]。与 β -

CD-MOF 和 β -CD 相比, 4-萜烯醇包合物分子结构上 -OH 基团拉伸振动向波数较小的方向略有偏移, 从 3420 cm^{-1} 偏移至 3400 cm^{-1} , 这一结果表明 4-萜烯醇与母体材料之间存在氢键相互作用。同时, 两种包合物在 1415 cm^{-1} 处均出现相较于母体材料更明显的吸收峰, 该峰临近 4-萜烯醇 1430 cm^{-1} 处的吸收带, 这表明 4-萜烯醇成功封装在包合物中, 与游离的 4-萜烯醇相比, 包合物中 1430 cm^{-1} 的特征带移到了 1415 cm^{-1} , 与 YANG 等^[30] 研究结果符合, 表明 β -CD-MOF 和 β -CD 与 4-萜烯醇之间存在相互作用。

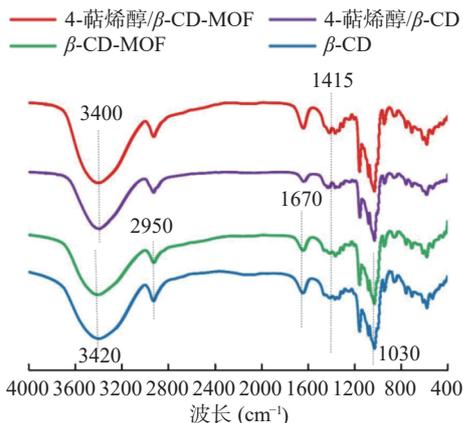


图3 4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物、4-萜烯醇/ β -CD 包合物、 β -CD-MOF 和 β -CD 的红外光谱图

Fig.3 Infrared spectrogram of terpinen-4-ol/ β -CD-MOF, terpinen-4-ol/ β -CD, β -CD-MOF and β -CD

综上所述, 4-萜烯醇与 β -CD-MOF 成功复合, 形成了新物质。相较于母体材料的红外光谱, 两种包合物的图谱中均未出现新的特征峰, 表明包封过程中无新化学键引入, 主客体分子原有的化学结构并未发生改变, 即包合物的形成对 4-萜烯醇原有的理化功能特性没有影响, 与 HU 等^[9] 封装薄荷醇的红外光谱结论一致。

2.2.3 X 射线衍射图谱分析 X 射线衍射分析是利用晶体形成的 X 射线衍射, 对物质进行内部原子在

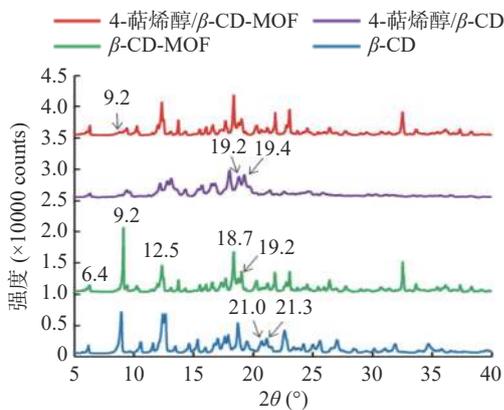


图4 4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物、4-萜烯醇/ β -CD 包合物、 β -CD-MOF 和 β -CD 的 X 射线衍射图谱

Fig.4 X-ray diffraction patterns of terpinen-4-ol/ β -CD-MOF, terpinen-4-ol/ β -CD, β -CD-MOF and β -CD

空间分布状况的结构分析方法。结果如图 4 所示, β -CD-MOF 与天然 β -CD 的 XRD 图谱存在明显差异, 与 β -CD 相比, β -CD-MOF 的许多衍射峰发生了轻微移动, 有的峰消失, 有的峰被其他更清晰的特征峰取代, 在 $2\theta=5^\circ\sim 50^\circ$ 扫描范围内, β -CD-MOF 在 6.4° 、 9.2° 、 12.5° 、 18.7° 和 19.2° 出现晶体的特征衍射峰^[31]。该结果表明, β -CD 分子与 K^+ 相互作用形成了更有序的晶体结构, 这与 SEM 的结果一致。

X 射线衍射是检测粉末或微晶状态下包合物晶体结构的方法, 若形成了真正的包合物, 那么其衍射图谱应该与母体材料存在明显不同^[31]。采用 XRD 对 4-萜烯醇/ β -CD-MOF 和 4-萜烯醇/ β -CD 两种包合物的结晶结构进行分析, 结果如图 4 所示。与母体材料相比, 包合物的特征峰出现变弱或消失的情况。相比之下, β -CD 在 21.0° 、 21.3° 处的峰转移到了 4-萜烯醇/ β -CD 包合物中对应的角度较低的 19.2° 、 19.4° 处; β -CD-MOF 中 9.2° 处的峰在 4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物中消失, 且两种包合物的峰值强度相对于母体材料均有所下降, XRD 结果表明, 壁材分子与 4-萜烯醇分子之间形成了新的复合物, 与 YANG 等^[19] 制备 4-萜烯醇/ β -CD 包合物的实验结果相符。

2.2.4 热重分析 热稳定性是衡量 β -CD-MOF 材料是否具有开发价值的重要指标, 热重分析是指在程序控制温度下测量样品的质量与温度变化关系的一种热分析技术, 用来研究材料的热稳定性和组分,

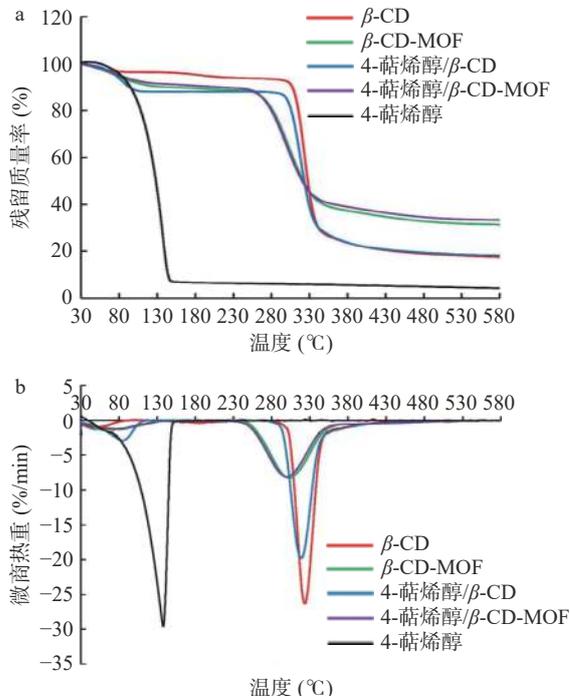


图5 β -CD、 β -CD-MOF、4-萜烯醇/ β -CD 包合物、4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物以及游离态 4-萜烯醇的 TGA 曲线(a)和 DTG 曲线(b)

Fig.5 TGA curve (a) and DTG curve (b) of β -CD, β -CD-MOF, terpinen-4-ol/ β -CD, terpinen-4-ol/ β -CD-MOF and pure terpinen-4-ol

微商热重曲线(Derivative thermogravimetric curve, DTG)是对由热重法得到的 TGA 曲线进行微商处理得到的曲线。本研究以天然 β -CD 作为对照,对合成的 β -CD-MOF 进行了热重分析。如图 5 所示, β -CD 仅在 280~380 °C 温度范围内出现一个失重峰,而 β -CD-MOF 在 50~100 °C 和 280~380 °C 出现两个失重过程, HU 等^[9]报道了低温失重峰与材料吸附的水和/或甲醇分子的蒸发有关。天然 β -CD 内几乎无溶剂残留,因此不存在低温失重峰,而 β -CD-MOF 在制备过程中不可避免地存在溶剂残留;高温失重峰对应材料本身的热分解。在接近 600 °C 时, β -CD 和 β -CD-MOF 的残留质量率分别为 17.15% 和 31.22%,且后者的失重峰更平缓,DTG 峰值更小,表明 β -CD-MOF 具备更完整更稳定的晶体结构;然而, β -CD-MOF 的热降解温度相对较低,导致其热稳定性下降的原因可能是其内部作用力较弱的金属配位键和疏松多孔的晶体结构。

为了确定包埋在 β -CD-MOF 空腔内的 4-萜烯醇的热稳定性,对最佳包封比例下制备的 4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物进行热重-差热分析,以包封比例相同的 4-萜烯醇/ β -CD 包合物和游离态的 4-萜烯醇

作为对照。测试结果如图 5 所示,4-萜烯醇的失重主要集中在 50~160 °C 范围内,表明其挥发性强,热稳定性差。与 β -CD 和 β -CD-MOF 相比,包合物在 50~160 °C 范围内存在明显的失重峰,表明 4-萜烯醇成功进入到 β -CD-MOF 和 β -CD 的空腔内;与游离态的醇相比,包合物的存在可以延缓 4-萜烯醇的蒸发速率,将 4-萜烯醇应用的温度范围从 30~160 °C 扩大到 30~350 °C。而在两种包合物中,4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物的残留质量率更高,失重峰更平缓,热稳定性更强,该结论与 YU 等^[24]报道一致。以上结果表明, β -CD-MOF 在改善化合物的热稳定性领域具有潜在应用价值,将 4-萜烯醇封装在 β -CD-MOF 中可以实现对 4-萜烯醇的有效保存。

2.3 4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物的抑菌效果

采用牛津杯法测量 4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物的抑菌环直径以分析其抑菌效果,结果如表 1 所示。牛津杯法实验过程中,4-萜烯醇浓度已达到对应微生物的最低抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC),查阅文献 [2] 可知,三者敏感性存在差异,金黄色葡萄球菌敏感性最高,单增李斯特菌次之,大肠杆菌最低。

表 1 4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物的抑菌环直径(mm)

Table 1 Bacteria inhibition ring diameter of terpinen-4-ol/ β -CD-MOF (mm)

组别	<i>E. coli</i>				<i>S. aureus</i>				<i>L. monocytogenes</i>			
	12 h	24 h	36 h	48 h	12 h	24 h	36 h	48 h	12 h	24 h	36 h	48 h
无菌生理盐水	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
β -CD-MOF	0.0	0.4	0.7	1.0	0.0	0.4	0.8	1.1	0.0	0.4	0.7	0.9
4-萜烯醇/ β -CD-MOF	0.5	1.2	2.7	3.6	1.1	3.2	4.8	6.5	0.8	2.2	3.8	5.2

恒温培养 48 h 后,与空白组无菌生理盐水相比,对照组 β -CD-MOF 出现极小的抑菌环,可能是由于制备过程中晶体孔道内残留乙醇的挥发;实验组 4-萜烯醇/ β -CD-MOF 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌的抑菌环直径分别为 3.6、6.5、5.2 mm,表明 4-萜烯醇对三种微生物均具有一定的抑菌活性,其中,对金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的抑制活性优于大肠杆菌,这可能是由于革兰氏阴性菌细胞壁中存在脂多糖,且金黄色葡萄球菌中脂多糖含量更高,阻碍了生物活性物质到达细胞膜,减缓了微生物的裂解速率^[31],与潘晓丹^[20]和 YU 等^[24]报道的抗菌实验结果相符。随着时间的延长,抑菌环直径逐渐增大,表明包合物具有良好的缓释效果和长效抑菌能力。

3 结论

本研究以 β -CD 为原料合成能够高效包封 4-萜烯醇的金属有机框架材料 β -CD-MOF,探究了最佳的包封条件,提高了 4-萜烯醇的附载量,证明了包合物的抑菌效果。SEM 结果证明了 β -CD-MOF 的合成机理即 β -CD 分子在 K^+ 的桥连作用下能够相互堆叠,不断延展,从而形成排列整齐规则,疏松多孔的

β -CD-MOF。当 4-萜烯醇与 β -CD-MOF 质量比为 1:1 时,载药量和包封率可达 21.15% 和 26.58%,远高于其他质量比,且比相同制备条件下的 4-萜烯醇/ β -CD 的载药量(20.38%)和包封率(23.19%)分别高出 0.77% 和 3.39%。傅里叶红外光谱和 X 射线衍射测试表明,4-萜烯醇成功封装在包合物中且与壁材之间存在氢键相互作用;热重分析证明,包合物的存在可以延缓 4-萜烯醇的挥发速率,将 4-萜烯醇应用的温度范围从 30~160 °C 扩大到 30~350 °C。4-萜烯醇/ β -CD-MOF 包合物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌三种常见细菌均具有一定的抑菌活性,且包合物具有长效抑菌能力和良好的缓释效果。

本研究证明了将 4-萜烯醇封装在 β -CD-MOF 中可以实现对醇有效稳定的保存,体现出 β -CD-MOF 作为挥发性化合物的载体具有巨大的潜力,在抗菌实验的基础上,未来可以将这种绿色安全的新型包合物制备成凝胶或薄膜材料应用冷链生鲜食品的抗菌保鲜中,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 霍若冰, 李洋, 徐瞳晖, 等. 鱼腥草提取液-壳聚糖抗菌复合膜对低温贮藏蓝莓的保鲜作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(8): 153-162. [HUO R B, LI Y, XU T H, et al. Freshness preservation of blueberries stored at low temperatures by Fritillaria extract-chitosan antimicrobial composite film[J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(8): 153-162.]
- [2] 杜清, 钟雨樨, 杨明, 等. 松油烯-4-醇的药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(14): 265-271. [DU Q, ZHONG Y X, YANG M, et al. Progress of pharmacological effects of Pinene-4-ol[J]. Chinese Journal of Experimental Formulas, 2023, 29(14): 265-271.]
- [3] CHENG F, MO Y N, CHEN K Y, et al. Integration of metabolomics and transcriptomics indicates changes in MRSA exposed to terpinen-4-ol[J]. BMC Microbiology, 2021, 21(1): 305.
- [4] JOHANSEN B, DUVAL R E, SERGERE J C. First evidence of a combination of terpinen-4-ol and α -terpineol as a promising tool against ESKAPE pathogens[J]. Molecules, 2022, 27(21): 7472.
- [5] CORDEIRO L, FIGUEIREDO P, SOUZA H, et al. Terpinen-4-ol as an antibacterial and antibiofilm agent against *staphylococcus aureus*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(12): 4531.
- [6] ZHAO L J, DUAN F X, GONG M, et al. (+)-Terpinen-4-ol inhibits bacillus cereus biofilm formation by upregulating the interspecies quorum sensing signals diketopiperazines and diffusing signaling factors[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(11): 3496-3510.
- [7] 王梅竹, 罗红梅, 曹煜, 等. 松油烯-4-醇对白念珠菌 PLB1、SAP2 基因表达的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2014, 39(6): 809-812. [WANG M Z, LUO H M, CAO Y, et al. Effects of pinacolen-4-ol on PLB1 and SAP2 gene expression in *Candida albicans*[J]. Journal of Guiyang Medical College, 2014, 39(6): 809-812.]
- [8] 瞿任, 康颖倩, 赵亮, 等. 植物精油组份松油烯-4-醇抗真菌作用研究[C]//中国菌物学会. 2012年中国菌物学会学术年会会议摘要, 2012: 130. [QU R, KANG Y Q, ZHAO L, et al. Antifungal effects of the essential oil component turpentine-4-ol[C]//Chinese Society of Mycology. Abstracts of the 2012 Annual Meeting of the Chinese Mycological Society, 2012: 130.]
- [9] HU Z M, SHAO M, ZHANG B, et al. Enhanced stability and controlled release of menthol using a β -cyclodextrin metal-organic framework[J]. Food Chemistry, 2022, 374: 131760.
- [10] KANG L X, LIANG Q F, ABDUL Q, et al. Preparation technology and preservation mechanism of γ -CD-MOFs biological packaging film loaded with curcumin[J]. Food Chemistry, 2023, 420: 136142.
- [11] LI H, SHI L F, LI C, et al. Metal-Organic framework based on α -cyclodextrin gives high ethylene gas adsorption capacity and storage stability[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2020, 12(30): 34095-34104.
- [12] CHEN X J, GUO T, ZHANG K K, et al. Simultaneous improvement to solubility and bioavailability of active natural compound isosteviol using cyclodextrin metal-organic frameworks[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2021, 11(9): 2914-2923.
- [13] QIU C, WANG J P, ZHANG H, et al. A novel approach with controlled nucleation and growth for green synthesis of size-controlled cyclodextrin-based metal-organic frameworks based on short-chain starch nanoparticles[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(37): 9785-9793.
- [14] ZHAO K N, GUO T, WANG C F, et al. Glycoside scutellarin enhanced CD-MOF anchoring for laryngeal delivery[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2020, 10(9): 1709-1718.
- [15] XIONG Y H, WU L, GUO T, et al. Crystal transformation of β -CD-MOF facilitates loading of dimercaptosuccinic acid[J]. American Association of Pharmaceutical Scientists, 2019, 20(6): 224-224.
- [16] 张波. 环糊精金属有机框架作为活性小分子载体材料的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2022. [ZHANG B. Cyclodextrin metal-organic frameworks as carrier materials for active small molecules[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2022.]
- [17] 刘娟. β -环糊精-钾 MOF 的制备及其复合材料在电化学传感中的应用研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2021. [LIU J. Preparation of β -cyclodextrin-potassium MOF and its composites in electrochemical sensing[D]. Hengyang: Nanhua University, 2021.]
- [18] BASAK Y, SERPIL S, GULUM S. Microencapsulation of wheat germ oil[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(6): 3590-3597.
- [19] YANG Z J, XIAO Z B, JI H B. Solid inclusion complex of terpinen-4-ol/ β -cyclodextrin: kinetic release, mechanism and its antibacterial activity[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2014, 30(2): 179-187.
- [20] 潘晓丹. 环糊精 MOF 材料负载百里香酚及在樱桃番茄保鲜中应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2022. [PAN X D. Cyclodextrin MOF materials loaded with thymol and its application in the preservation of cherry tomatoes[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2022.]
- [21] LI S Q, HU X X, CHEN S Y, et al. Synthesis of γ -cyclodextrin metal-organic framework as ethylene absorber for improving postharvest quality of kiwi fruit[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 136: 108294.
- [22] HARTLIEB K J, FERRIS D P, HOLCROFT J M, et al. Encapsulation of ibuprofen in CD-MOF and related bioavailability studies[J]. Molecular Pharmaceutics, 2017, 14(5): 1831-1839.
- [23] BENEDETTO G, CLEARY B M, MORRELL C T, et al. CD-MOF-1 for CO₂ uptake: Remote and hybrid green chemistry synthesis of a framework material with environmentally conscious applications[J]. Journal of Chemical Education, 2023, 100(3): 1289-1295.
- [24] YU L L, WANG X X, WEI Y Y, et al. A cyclodextrin metal-organic framework loaded with terpinen-4-ol and its application to control gray mold in strawberry[J]. Food Control, 2023, 155: 110053.
- [25] WANG Y, LI M F, WANG L, et al. Improvement of the stabilities and antioxidant activities of polyphenols from the leaves of Chinese star anise (*Illicium verum* Hook. f.) using beta-cyclodextrin-based metal-organic frameworks[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 101(1): 287-296.
- [26] BLIGHT B A, AHMAD T I, SHEPHERD H J, et al. Sterol uptake by an alkali- β -Cyclodextrin metal-organic framework[J]. Crystal Growth & Design, 2020, 20(1): 43-48.
- [27] ZHANG H X, TIAN Y Q, BAI Y X, et al. Structure and properties of maize starch processed with a combination of α -amylase and pullulanase[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 52: 38-44.
- [28] WANG L, LIANG X Y, CHANG Z Y, et al. Effective formaldehyde capture by green cyclodextrin-based metal-organic framework[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(1): 42-46.
- [29] YANG A H, LIU H J, LI Z D, et al. Green synthesis of β -cyclodextrin metal-organic frameworks and the adsorption of quercetin and emodin[J]. Polyhedron, 2018, 159: 116-126.
- [30] YANG Z J, CHAI K G, JI H B. Selective inclusion and separation of cinnamaldehyde and benzaldehyde by insoluble β -cyclodextrin polymer[J]. Separation and Purification Technology, 2011, 80(2): 209-216.
- [31] QIN Y, WANG J P, QIU C, et al. Effects of degree of polymerization on size, crystal structure, and digestibility of debranched starch nanoparticles and their enhanced antioxidant and antibacterial activities of curcumin[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2019, 7(9): 8499-8511.