

山药多糖纳米粒的体外抗氧化活性

于莲^{1*}, 卢珊珊¹, 马淑霞², 张涛², 孟德欣², 郭宇¹

(1. 佳木斯大学药学院省高校生物药制剂重点实验室, 黑龙江 佳木斯 154007;
2. 佳木斯大学基础医学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

[摘要] 目的:湿磨法制备山药多糖纳米粒,星点设计优化最优处方。研究山药多糖纳米粒的体外抗氧化活性。方法:通过星点设计优化湿磨法制备的山药多糖纳米粒最优处方,SALD-2201 激光粒度分布仪检测其平均粒径及粒度分布。通过化学实验法和试剂盒法研究过氧化氢、羟自由基、超氧阴离子自由基、DPPH 的抗氧化能力,并测定其还原力与金属螯合力。结果:星点设计得最优工艺料液比 1:24、球磨转速 360 r·min⁻¹、球磨时间 36 h。SALD-2201 激光粒度分布仪测定 1.0% 粒径在 186 nm,80.0% 粒径 575 nm。经体外抗氧化实验证实,过氧化氢、DPPH、还原潜力与金属螯合力的自由基清除率随多糖浓度的增加而成增长趋势。其中山药多糖与其纳米粒对 DPPH 清除能力在 0.5,4,6,8 g·L⁻¹ 质量浓度下均有极显著差异。超氧阴离子自由基与羟自由基的抗氧化能力亦与多糖浓度成正相关。结论:山药多糖及其纳米粒体外抗氧化活性良好,且山药多糖纳米粒的体外抗氧化活性优于山药多糖。

[关键词] 湿磨法; 山药多糖纳米粒; 星点设计; 体外抗氧化
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)09-0147-05
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014090147
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000059.html>
[网络出版时间] 2014-02-25 13:39

Nanoparticles *in vitro* Antioxidant Activity of Polysaccharides from Chinese Yam

YU Lian^{1*}, LU Shan-shan¹, MA Shu-xia², ZHANG Tao², MENG De-xin², GUO Yu¹

(1. Biological Medicine Preparations Key Laboratory of Jiamusi University, Jiamusi 154007, China;
2. Basic Medical College of Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

[Abstract] Objective: To prepare nanoparticles containing polysaccharides from Chinese Yam by using wet grinding, and opyomize the best prescription by central composite design. Method: To distribute test average particle size and particle size distribution by SALD-2201 laser particle size. Studies on 6 *in vitro* antioxidant indexes superoxide anion as free radical and hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, DPPH, reduction potentials and metal chelating. Result: optimal preparation of Chinese Yam polysaccharides on nanoparticles technology as Liquid is 1:24, ball mill is 36 h, speed time of ball mill is 360 r·min⁻¹. The size of made from Nano-particle as 1% size is 186 nm, 80.0% size is 575 nm. Conclusion: The antioxidant *in vitro* experiments confirmed that the yams over nanoparticles *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides from Chinese Yam polysaccharides.

[Key words] wet milling method; nanoparticles of Chinese Yam polysaccharides; central composite design; *in vitro* antioxidant

山药为薯蓣科薯蓣属,具性平,味甘,健脾止泻、补肺益肾等药用价值^[1]。其所含的丰富山药多糖对人体具有能清除体内自由基、抗病毒、抗癌、降血糖等多种生理功能。随着生活水平的不断提高,抗氧化抗衰老成为大众日益关心的问题,山药多糖的

[收稿日期] 20131031(014)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274101)
[通讯作者] * 于莲,教授,从事靶向制剂和中药微生态制剂研究,Tel:13845405552,E-mail:jdyulian@163.com

抗氧化功能研究定将成为研究热点^[2]。

纵观国内外对山药多糖体外抗氧化活性的研究,发现大部分报道是以山药多糖的粗提液为研究对象^[3]。本文则以 95% 高纯度山药多糖为原料,利用球磨机加工纳米级多糖,以期更大程度上发挥其活性功能。在活性研究方面,台湾学者 Yi-Tzu Chen^[4-5]在其发表的两篇关于加热温度与 pH 值对山药粗提液的抗氧化活性的研究中,使用了 DPPH 自由基清除力测定、金属离子螯合能力测定两种方法。日本学者 Takeshi 在关于山药粗提液的抗氧化研究中,使用了 DPPH 自由基清除力测定、超氧阴离子清除力测定以及过氧化氢清除力测定等几种方法。目前,单凭一种或两种方法对抗氧化物质进行活性评价并不科学,本文通过对过氧化氢、羟自由基、超氧阴离子、DPPH 自由基的清除抑制作用来衡量抗氧化活性的高低;考察还原能力;对金属离子的螯合能力对氧化酶的抑制作用考察,能够较全面科学地评价其抗氧化活性。

1 材料

1.1 药品 本实验采用陕西慈缘生物技术有限公司提供的 95% 纯度山药多糖(批号 CY121122)。山药为薯蓣科(Dioscoreaceae)薯蓣属(*Dioscorea*),山药多糖系植物山药(*Dioscorea opposita* Thunb)提取物,提取工艺为水提法。

1.2 试剂和仪器 30% 过氧化氢(AR),维生素 C(VC,AR),磷酸二氢钾 AR(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号分别为 20110716, 20110218, 20110514);氯化亚铁、氯化铁(天津市光复精细化工研究所,批号分别为 20121122, 20120312);DPPH,菲咯嗪(美国 Sigma 公司,批号分别为 D9132,20120623);抗超氧阴离子自由基试剂盒、羟自由基试剂盒(南京建成生物研究所,批号分别为 20130222,20130128)。SALD-2201 激光粒度分布仪(岛津仪器有限公司),UV757CRT 紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),行星式球磨机(上海顶派机械设备技术有限公司)。

2 方法

2.1 湿磨法制备山药多糖纳米粒方法 湿磨法制备山药纳米粒,将无水乙醇、山药多糖依次加入玛瑙罐内,充分搅匀后加入玛瑙球 200 g,并不断搅拌,封灌。

2.2 山药多糖纳米粒的制备处方星点设计优化 选定 X_1 (料液比)、 X_2 (球磨转速)、 X_3 (球磨时间)3 个因素,采用 3 因素 5 水平的星点设计试验。因素水平见表 1,和星点设计的多元线性拟合见

表 2。

表 1 山药多糖纳米粒制备工艺星点试验因素水平

水平	X_1 料液比	X_2 球磨转速 /r·min ⁻¹	X_3 球磨时间 /h
-1.682	1:10	200	20
-1	1:14	241	24
0	1:20	300	30
1	1:26	360	36
1.682	1:30	400	40

表 2 山药多糖纳米粒制备工艺星点试验安排

No.	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1.682	0	0
10	1.682	0	0
11	0	-1.682	0
12	0	1.682	0
13	0	0	-1.682
14	0	0	1.682
15~21	0	0	0

2.3 平均粒径及粒度分布检测 随机取适量样品 3 份,分别从中取少量山药多糖纳米悬浊液,滴入 SALD-2201 激光粒度分布测定仪进样池内进行测定。

2.4 山药多糖及其纳米粒体外抗氧化活性研究

2.4.1 对 H₂O₂ 的抗氧化效果 过氧化氢(H₂O₂)清除活性的测定参照 Liu 等^[6]报道的方法稍作修改。加入由 50 mmol·L⁻¹的磷酸缓冲液(pH 7.4)配制的 5 mmol·L⁻¹的 H₂O₂ 溶液 2.8 mL,再分别加入 0.5,1,2,4,8,16 g·L⁻¹的多糖溶液 1.0 mL,用纯净水补齐至 10.0 mL。25 ℃ 放置 10 min 后,于波长 230 nm 处测定吸光度($A_{\text{样品}}$),对照管为不加多糖溶液,以维生素 C(VC)作为对比。计算清除率。

清除率 = ($A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}$) / $A_{\text{对照}} \times 100\%$

2.4.2 对 O₂· 的抗氧化活性 Wang^[7]等报道的方法稍作修改,按照南京建成生物研究所抗超氧阴离子自由基试剂盒说明书操作,模拟机体中黄嘌呤与黄嘌呤氧化酶反应系统,当被测样本中含有 O₂· 抑制剂时,则比色时测定管的吸光度低于对照管的吸光度,而如

果被测样本中含有产生 $O_2\cdot$ 抑制剂时,则比色时测定管的吸光度高于对照管的吸光度,通过以 VC 做标准,可计算出被检物品对 $O_2\cdot$ 的影响能力。

2.4.3 对 $\cdot OH$ 的抗氧化效果 羟基自由基($\cdot OH$)清除活性的测定参照惠和平^[8]等报道的方法稍作修改。按照南京建成生物研究所羟自由基试剂盒说明书操作,实验采用的 Fenton 反应是常见的产生羟自由基的化学反应,当给予电子受体后,形成红色物质,其呈色与 $\cdot OH$ 的多少成正比关系。

2.4.4 对 DPPH $\cdot$ 清除能力的测定 DPPH $\cdot$ 自由基清除活性的测定参照 Li^[9]等报道的方法稍作修改。取样品液,加入等体积 DPPH 溶液(溶于 95% 的乙醇),混匀后在室温下避光反应 20 min, 1 000 $r\cdot min^{-1}$ 离心 10 min, 在 517 nm 处测 A_i ; 空白组为样品液加入乙醇溶液测 A_j ; 对照组 DPPH 溶液与蒸馏水混合在 517 nm 下测 A_c ; 并以等体积蒸馏水和 95% 的乙醇混合液作为空白调零。清除率按下式计算。

$$DPPH\cdot \text{清除率} = [1 - (A_i - A_j)/A_c] \times 100\%$$

2.4.5 还原力测定 还原潜力的测定参照 Takeshi Nagai^[10]等报道的方法稍作修改。采用普鲁士兰法,取一定浓度的样品溶液 0.5 mL 加入 0.2 $mol\cdot L^{-1}$, pH 6.6 的磷酸盐缓冲液和 1% 的铁氰化钾 $K_3Fe(CN)_6$ 溶液各 2.5 mL 并混合均匀,混合液于 50 $^{\circ}C$ 保温水浴 20 min 后加入 2.5 mL 10% 的三氯乙酸溶液,混合后以 3 000 $r\cdot min^{-1}$ 离心 10 min。取上清液 2.5 mL, 加 2.5 mL 蒸馏水和 1 mL 0.1% 的 $FeCl_3$ 混合均匀,静置 10 min 后测定 700 nm 处 A_o 。

还原潜力依下面公式计算:

$$\text{还原潜力} = A_1 - A_2$$

其中 A_1 为样品实验的吸光值; A_2 为样品干扰实验(以水代替氯化铁溶液)的吸光值。

2.4.6 金属螯合能力的测定 金属离子螯合能力的测定参照 Chin-Lin Hsu 等报道的方法稍作修改。对二价铁离子的螯合能力测定方法:向不同浓度的样品(0.62 ~ 3.43 mL)中加入 0.10 mL, 2 $mmol\cdot L^{-1}$ 的 $FeCl_2$ 和 0.40 mL, 5 $mmol\cdot L^{-1}$ 的 ferrozine(菲咯啉溶液),摇匀,在室温 25 $^{\circ}C$ 下放置 10 min, 在 562 nm 处测定吸光度,每个浓度重复 3 次,蒸馏水代替样品作为空白。

$$\text{螯合能力} = (A_o - A_1)/A_o \times 100\%$$

A_o 为空白的吸光度, A_1 为样品的吸光度。

3 结果

3.1 经星点设计优化得最优工艺 料液比 1:24、球磨转速 360 $r\cdot min^{-1}$, 球磨时间 36 h(图 1)。经

Design-Expert 软件优化效应面如图 2~4 所示。

Criteria						
Solutions						
Constraints						
Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
A:料液比	is in range	14.1	25.9	1	1	3
B:转速	is in range	240.5	359.5	1	1	3
C:时间	is in range	24.1	35.9	1	1	3
80%纳米粒粒	minimize	100	813	1	1	3
Solutions						
Number	料液比	转速	时间	80%纳米粒粒	Desirability	Selected
1	24.25	359.50	35.90	587.917	0.316	Selected

图 1 湿磨法制备山药多糖纳米粒的最优工艺筛选

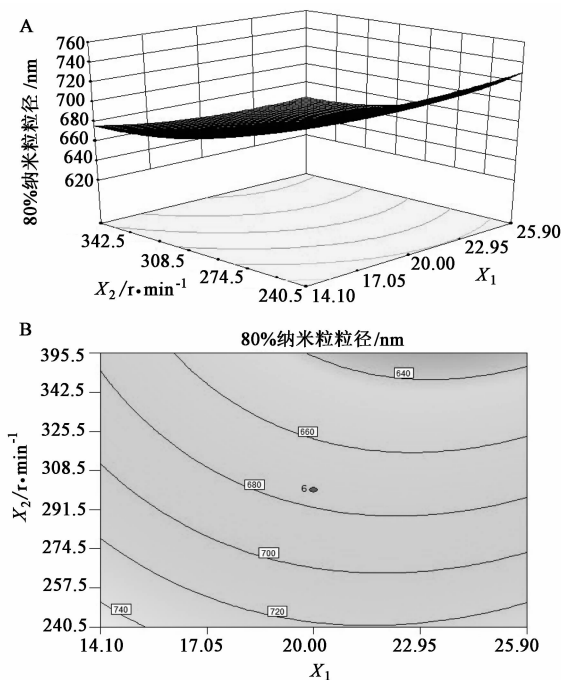


图 2 料液比和转速对纳米粒粒径交互影响的三维曲面(A)和等高线(B)

3.2 SALD-2201 激光粒度分布仪测定山药多糖纳米粒 1.0% 粒径在 186 nm, 80.0% 粒径 575 nm(图 5)。

3.3 山药多糖纳米粒的外观与色泽 冷冻干燥后, 山药多糖纳米粒为棕黄色粉末状固体。

3.4 山药多糖纳米粒体外抗氧化活性的研究

3.4.1 山药多糖及其纳米粒清除 H_2O_2 活性 与山药多糖组相比, 山药多糖纳米粒组对 H_2O_2 的清除活性均有显著性差异。见图 6。

3.4.2 山药多糖及其纳米粒清除超氧阴离子自由基活性 与山药多糖组相比, 山药多糖纳米粒组对超氧阴离子自由基的清除活性有显著性差异, 其中, 质量浓度 16 $g\cdot L^{-1}$ 组有极显著性差异。见图 7。

3.4.3 山药多糖及其纳米粒清除羟自由基活性 与山药多糖组相比, 山药多糖纳米粒组对羟自由基

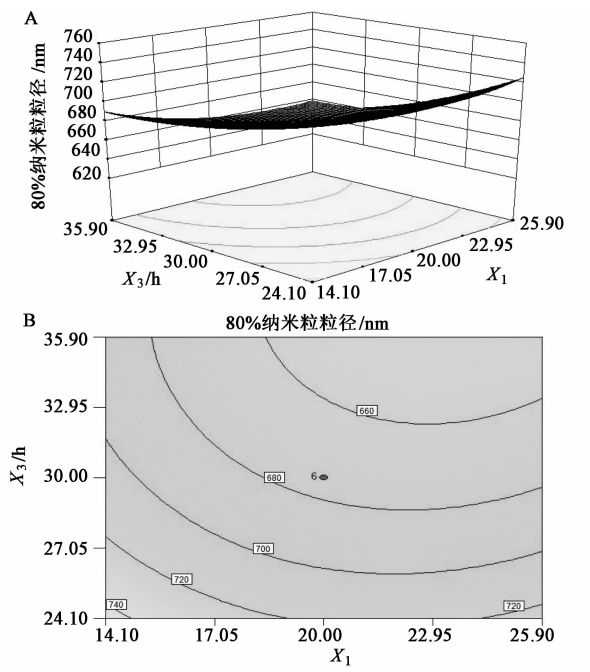


图 3 料液比和时间对纳米粒径交互影响的三维曲面 (A) 和等高线 (B)

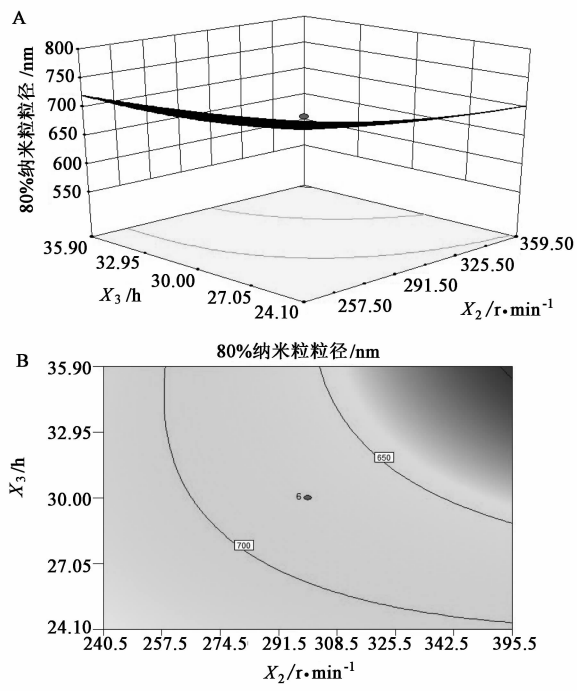


图 4 转速和时间对纳米粒径交互影响的三维曲面 (A) 和等高线 (B)

的清除活性有显著性差异,其中,浓度 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组有极显著性差异。见图 8。

3.4.4 山药多糖及其纳米粒清除 DPPH 活性 与山药多糖组相比,山药多糖纳米粒组对 DPPH 的清除活性有显著性差异,其中,质量浓度为 $0.5, 4, 8,$

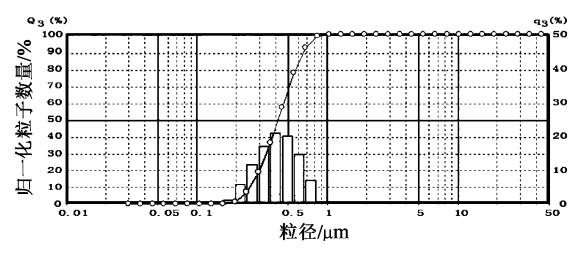
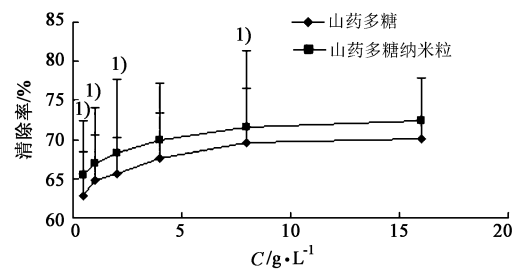


图 5 山药多糖纳米乙醇溶液平均粒径分布



与同质量浓度山药多糖组比较, $^1) P < 0.05, ^2) P < 0.01$ (图 7 ~ 11 同)

图 6 山药多糖和山药多糖纳米粒对 H_2O_2 清除效果 ($\bar{x} \pm s$)

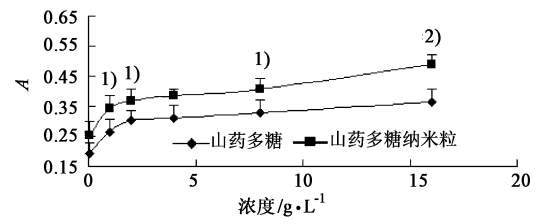


图 7 山药多糖和山药多糖纳米粒抗超氧阴离子自由基能力效果 ($\bar{x} \pm s$)

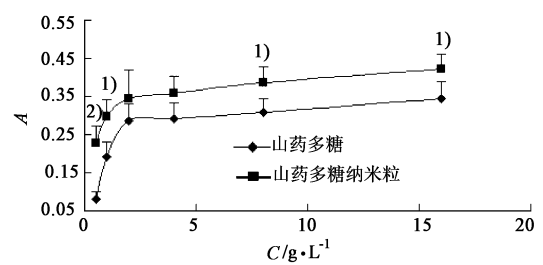


图 8 山药多糖和山药多糖纳米粒抑制羟自由基能力效果 ($\bar{x} \pm s$)

$16\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组有极显著性差异。见图 9。

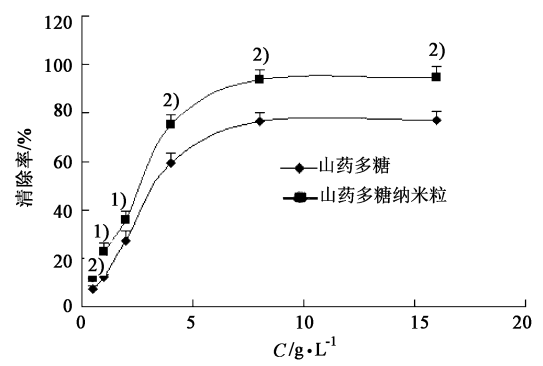


图 9 山药多糖和山药多糖纳米粒对 $\text{DPPH}\cdot$ 清除效果 ($\bar{x} \pm s$)

3.4.5 山药多糖及其纳米粒还原潜力 与山药多糖组相比,质量浓度为 $16\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的山药多糖纳米粒组还原潜力有显著性差异。见图 10。

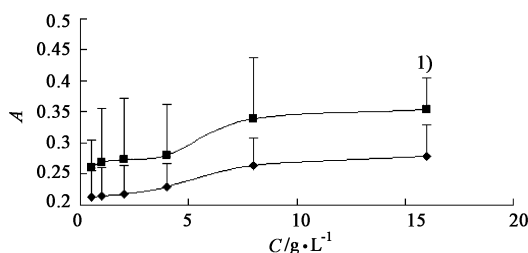


图 10 山药多糖和山药多糖纳米粒还原潜力效果($\bar{x} \pm s$)

3.4.6 山药多糖及其纳米粒金属螯合力 如图 11,与山药多糖组相比,质量浓度为 $8,16\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的山药多糖纳米粒组金属螯合力有显著性差异。见图 11。

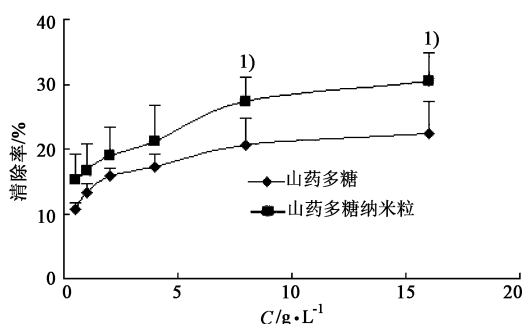


图 11 山药多糖和山药多糖纳米粒金属螯合能力效果($\bar{x} \pm s$)

4 讨论

山药多糖是山药中的主要活性成分。根据文献报道山药多糖是一种重要的益生元。对人体具有多种生理功能,能清除体内自由基、调节机体免疫力、抗病毒、抗癌、降血糖等。

纳米技术将使药物的生产实现低成本、高效率、自动化和大规模,而药物的作用将实现器官靶向、高效和低毒等革命性的突破^[11]。纳米药物的最大优点在于:容易进入细胞而实现高效;比表面积大,可链接或载带的功能基团或活性中心多;性能优越,便于生物降解或吸收。

衰老具有多层次、多原因的特点。代谢过程中所产生的自由基能作用于生物膜磷脂中的多不饱和脂肪酸,产生脂质过氧化物,进而与磷脂酰乙醇胺和蛋白质交联成大分子复合物——脂褐质(老年色素),这是机体老化的一种标志。据报道,山药多糖能降低机体脂褐质含量,这可能与清除体内自由基有关^[12]。

本实验运用化学方法分别测量分析了山药多糖及山药多糖纳米粒的体外抗氧化活性,表明它们在体外能够终止自由基链式反应而达到抗氧化目的。

实验结果表明山药多糖纳米粒较山药多糖具有更高的抗氧化活性,这可能归因于纳米颗粒所具有的多孔、中空、多层等结构特性,易于实现药物的缓控释放等功能。

[参考文献]

- [1] 江海燕,王婴. 山药及其制剂的质量研究进展[J]. 河北中医药学报, 2008, 23(3):48.
- [2] 郑晗,龚千锋,张的凤. 山药[J]. 食品与药品, 2007, 9(11):74.
- [3] Yan C, Chen D, Gu J, et al. Nanoparticles of 5-fluorouracil (5-FU) loaded *N*-succinyl-chitosan (Suc-Chi) for cancer chemotherapy: preparation, characterization-in-vitro drug release and anti-tumour activity [J]. J Pharmacy Pharmacol, 2006, 58(9):1177.
- [4] Yi-Tzu C, Kuo-Wei L. Effects of heating temperature on the total phenolic compound, antioxidative ability and the stability of dioscorin of various yam cultivars [J]. Food Chemistry, 2006, 27:955.
- [5] Yi-Tzu C, Kuo-Wei L. Effects of pH on the total phenolic compound, antioxidative ability and the stability of dioscorin of various yam cultivars [J]. Food Chemistry, 2008, 27:252.
- [6] Liu C, Wang C, Xu Z, et al. Isolation, chemical characterization and antioxidant activities of two polysaccharides from the gel and the skin of *Aloe barbadensis* Miller irrigated with sea water [J]. Process Biochemistry, 2007, 42(6):961.
- [7] Wang Z, Luo D. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from *Gynostemma pentaphyllum* Makino [J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 68(1):54.
- [8] 惠和平,封士兰,胡芳弟,等. 红芪多糖的体外抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学, 2010(8):4056.
- [9] Li X, Zhou A, Han Y. Anti-oxidation and anti-microorganism activities of purification polysaccharide from *Lygodium japonicum* in vitro [J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 66(1):34.
- [10] Takeshi Nagai, Nobutaka Suzuki, Toshio Nagashima. Antioxidative activity of water extracts from the yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) tuber mucilage tororo [J]. Eur J Lipid Sci Technol, 2006, 108:526.
- [11] 刘晓庚,陈优生,刘琴,等. 荷移光度法测定山药尿囊素的含量[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(5):197.
- [12] 李兰,蒋爱凤,刘坤. 怀山药活性多糖提取条件优化[J]. 河南科技学院学报, 2008, 36(2):63.

[责任编辑 聂淑琴]