

文章编号:2095-7386(2020)06-0017-06

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2020.06.003

松针总黄酮微胶囊工艺优化及对帕金森的辅助改善

曹侃

(芜湖职业技术学院 生物工程学院,安徽 芜湖 241000)

摘要:松针黄酮类化合物药理作用显著,在抗氧化、神经系统保护等方面都有所表现,但其易受到外界因素影响,稳定性差。本研究对松针总黄酮微胶囊的制备优化条件及其辅助改善帕金森(Parkinson's disease 即 PD)的作用进行了研究。采用微胶囊技术,用 β -环糊精包裹松针总黄酮,通过正交实验优化条件,再通过检测不同浓度的微胶囊样品对分化后的SH-SY5Y细胞的损伤干预作用和羟自由基清除能力来初步研究其对辅助改善PD的作用效果。结果显示:当芯壁比为15,搅拌温度为40℃,搅拌时间为60 min时所制得微胶囊较好,包埋率可达51.37%。采用6-OHDA损伤SH-SY5Y细胞建立帕金森体外细胞模型,松针总黄酮微胶囊在放置60 d后,给药组细胞活力明显升高,且其对羟自由基有较好的清除作用,表现优于VC。因此,本研究制备的松针总黄酮微胶囊可作为辅助改善PD的功能性产品进一步研究开发。

关键词:松针黄酮;微胶囊;PD

中图分类号:TQ819

文献标识码:A

Research on the optimization of Total Flavonoids of Pine needles microcapsule process and the assistant therapeutic effect on Parkinson's Disease

CAO Kan

(School of Bioengineering, Wuhu Institute of Technology, Wuhu 241000, China)

Abstract: Flavonoids of pine needles feature significant pharmacological actions, and certain effect in anti-oxidation, protection of the nervous system and so on. However, they are vulnerable to external factors and are of poor stability. This paper is a preliminary study on the optimization of preparation conditions of total flavonoids of pine needles microcapsules and the assistant effect of the same on Parkinson's Disease (PD). Such conditions were optimized with micro-encapsulation technology and through orthogonal experiment with β -cyclodextrin wrapping up total flavonoids of pine needles. After that, by measuring the intervention effect of microcapsule samples of different concentrations on differentiated SH-SY5Y cells and their hydroxyl radical scavenging ability, their effect on ameliorating PD was analyzed preliminarily. The results indicated that: at the core-wall ratio of 15, the stirring temperature of 40℃ and the stirring time of 60min, prepared microcapsules were better, with a micro-encapsulation efficiency up to 51.37%. By building an in vitro model of PD with 6-OHDA damaged SH-SY5Y cells and placing total flavonoids of pine needles microcapsules for 60 days, it was noticed that, cells with drug administration showed significantly higher viability, and better hydroxyl radical scavenging performance than VC. Therefore, the total fla-

收稿日期:2020-10-10.

作者简介:曹侃(1984-),女,研究方向为生物技术应用,E-mail:13866381709@126.com.

基金项目:安徽省教育厅自然科学重点项目(KJ2018A0694);安徽省质量工程教学创新团队项目(2019cxtd023);安徽省省级大规模在线开放课程(MOOC)示范项目(2018mooc494);安徽省省级高水平高职专业项目(2018ylzy156).

vonoids of pine needles microcapsules prepared in this research can be further developed as a functional product with assistant therapeutic effect on PD.

Key words: pine needle flavonoids; microcapsules; PD

1 引言

松针黄酮类化合物在抗菌、抗氧化、清热解毒、抗癌、保护心血管系统等方面有着显著效果^[1-5],且毒性小,安全性好,因此在功能性保健食品开发应用等方面有重要意义。然而,黄酮类成分容易受到外界因素,如温度、pH 等的影响,稳定性较差。如果将包含这些活性成分的提取物直接添加到食品中,容易使活性成分在食品的实际生产储藏过程中受到破坏,同时也会造成较低的生物利用率。此外,松针提取物本身也会有特殊气味,会影响产品风味。利用微胶囊技术对松针总黄酮提取物进行包埋,使囊心物质免受外界环境的影响,并屏蔽掉味道和气味,利于其在食品中作为功能性成分的应用。

目前中国社会老龄化问题日益突显,随着人们对健康意识的日益增强,中老年人越来越热衷于功能性保健食品。在我国,65 岁以上人群帕金森(PD)患病率约为 1.7%。PD 即帕金森病是一种常见的中枢神经系统退行性疾病,主要临床特征为静止震颤、肌僵直、不能运动或运动迟缓以及步态异常,严重影响到患者的生活质量^[6]。据相关文献报道,帕金森病人的黑质致密部多巴胺能神经元发生了变性、缺失,还出现了 α -突触核蛋白路易小体。而有研究显示,黑质多巴胺能神经元细胞会因为将 6-OHDA 注射到纹状体内而出现凋亡和坏死等形态学上的改变,所以 6-OHDA 这种神经毒素被认为与 PD 发病有关^[7]。SH-SY5Y 细胞即人神经母细胞瘤细胞,容易培养传代,检测方便,可操作性强,反复实验结果稳定。而且它是一种分化程度较低的肿瘤细胞,在形态、生理及生化功能方面与多巴胺能神经元具有较高的相似性。所以,采用 SH-SY5Y 细胞被 6-OHDA 损伤后建立体外 PD 模型来完成本研究^[8]。有研究表明某些植物,如何首乌、天麻、银杏等,其中的黄酮类成分有辅助改善 PD 相关症状的效果^[9-12],但目前还没有相关文献报道松针黄酮类成分的此类研究。因此,本文通过优化松针总黄酮微胶囊的制备工艺,并通过检测松针总黄酮微胶囊对分化后的 SH-SY5Y 细胞的损伤干预作用和羟自由基清除能力,初步研究其对辅助改善 PD 的作用,以期松针总黄酮作为功能性保健食品的开发与应用进一步拓宽思路。

2 材料与仪器

雪松松针采自安徽省芜湖市芜湖职业技术学院南校区校园内,经由芜湖职业技术学院汪刘琼副教授鉴定为松科雪松,属植物雪松松针。

β -CD、吐温-80 等:食品级,中国医药(集团)上海化学试剂公司;芦丁标准品(合肥博美生物科技有限公司,中国);SH-SY5Y 细胞由药大实验室提供;MTT、DMSO(Sigma)。其余试剂如无水乙醇、硫酸亚铁、 H_2O_2 、水杨酸钠等为分析纯。

酶标仪(Multiskan MK3 型);二氧化碳恒温培养箱(NU-5500E);DK-98-1 型电热恒温水浴锅;真空干燥箱 DZF-6020(上海三发科学仪器有限公司);分光光度计 Tu-1800pc 型(北京普析仪器有限公司);数显恒温磁力搅拌器 85-2(常州金坛友联仪器有限公司);旋转蒸发器(上海上天精密仪器有限公司)。

3 实验方法

3.1 松针总黄酮提取液的制备

新鲜雪松松针采集清洗后,于 50℃ 热风干燥、粉碎,备用。按料液比 1:30 加入 60% 乙醇,微波 700 W 处理 2 min 后,浸提 24 h 后过滤浓缩,获得松针总黄酮提取液。

3.2 松针总黄酮微胶囊的制备

准确称取 β -环糊精,加入一定体积蒸馏水配制成过饱和溶液,加入 1 mL 松针总黄酮提取液,2 滴吐温 80,在一定温度的磁力搅拌器上搅拌一段时间,然后将混合液放置于 4℃ 冰箱中保持 24 h^[13,14],滤出上清液,将下层湿浆进行真空干燥,得到松针总黄酮微胶囊。

3.3 微胶囊包埋率的测定

将 1 g 松针总黄酮微胶囊在 50% 乙醇中超声溶解 30 min,上清液定容到 25 mL,滤液中黄酮含量即为微胶囊中黄酮含量;将 1 g 松针总黄酮微胶囊在无水乙醇中超声溶解 30 min,上清液定容到 25 mL,滤液中黄酮含量即为微胶囊表面黄酮含量;则包埋率计算为:(微胶囊中黄酮含量-微胶囊表面黄酮含量)/微胶囊中黄酮含量^[14-15]。

黄酮的含量测定参照并改进方法^[14,16-18],精密称取干燥至恒重的芦丁标准品 10 mg,置于 100 mL

烧杯中,用 70% 乙醇定容至 50 mL 容量瓶,得到 0.2 mg/mL 的芦丁标准液。在六个 10 mL 容量瓶中,分别准确吸取此标准液 0.00、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50 mL,然后均加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL,摇匀静置 6 min,后加入 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀静置 6 min,再加 4% 氢氧化钠溶液 4 mL,摇匀静置 6 min,最后用 70% 乙醇定容,在波长 510 nm 处测吸光度,并绘制芦丁标准曲线,标准曲线回归方程为:

$$y = 11.206x + 0.0032 (R^2 = 0.9994) \quad (1)$$

3.4 松针总黄酮微胶囊制备工艺优化

3.4.1 单因素实验

针对壁芯比(5、10、15、20、25)(v:v)、搅拌温度(20、30、40、50、60)℃和搅拌时间(20、40、60、80、100)min 三个因素,分别进行单因素水平实验,平行三次,以包埋率为指标,得到每个因素的最佳水平。

3.4.2 正交实验优化制备工艺条件

通过 L9(33) 正交实验考查壁芯比、搅拌温度和搅拌时间对包埋率的影响,获得松针总黄酮微胶囊制备的最优工艺条件。

3.5 松针总黄酮微胶囊对 PD 防治的辅助作用

3.5.1 MTT 法检测不同浓度的样品对分化后的 SH-SY5Y 细胞的损伤干预作用^[8,19]

(1) 选择生长至指数生长期的分化后的 SH-SY5Y 细胞铺板,以 4×10^4 个/mL 密度接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,在 37℃、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养过夜。

(2) 分别加入 60 mM 的 6-OHDA 和 0.006 25、0.012 5、0.025、0.05、0.1、0.2 mg/mL 的样品共孵育 48 h。各浓度设置 6 个复孔,同时设置空白组。

(3) 共孵育 48 h 后,每孔加入 20 μ L MTT 溶液,37℃孵育 4 h,吸弃上清,每孔加入 150 μ L DMSO,置摇床上振荡 10 min 充分溶解结晶物。置于酶标仪中以 570 nm 为检测波长,630 nm 为参比波长测定各孔的 OD 值。

3.5.2 羟自由基清除能力的检测^[20,21]

吸取 100 μ L 不同浓度的样品待测液,加入 50 μ L 的硫酸亚铁溶液(1.5 mM),35 μ L H₂O₂ 溶液(6 mM),15 μ L 水杨酸钠溶液(20 mM),再加 50 μ L 去离子水,37℃混匀反应 1 h,于 562 nm 波长测定吸光度。每一浓度梯度做三组平行。

$$\text{清除率} = [1 - (A1 - A2) / A0 - A02] \times 100\%$$

(2)

其中 A0 为空白吸光度,A02 为空白本底,A1 为样品吸光度,A2 为样品本底的吸光度。

4 结果与分析

4.1 松针总黄酮微胶囊制备工艺优化

4.1.1 单因素实验结果

由图 1 可知,松针总黄酮微胶囊的包埋率随着壁芯比的增加会先呈现上升趋势,直至壁芯比为 15 时,又转为下降趋势。这与包埋载体有一定的承载能力有关,当壁芯比到达 15 时,对松针总黄酮的包埋趋于饱和,因此,若继续增加壁芯比反而会降低包埋率。

由图 2 可知,松针总黄酮微胶囊的包埋率随着搅拌温度的升高而增加,直至 40℃附近时,转为下降趋势。因此,当温度升高,黄酮分子运动增加有助于包埋,但温度过高,运动过快反而不利于包埋效果,且过高的温度会使黄酮活性下降,导致包埋效率减弱。

由图 3 可知,松针总黄酮微胶囊的包埋率随着搅拌时间的延长而升高,直至 60 min 左右时,转为下降趋势。说明适度的搅拌时间利于松针总黄酮的被包埋,而过长的搅拌时间反而会使已包埋的黄酮出来^[22]。

根据单因素实验结果,利用正交实验助手设计 L9(33) 正交实验,考察壁芯比、搅拌温度、搅拌时间对包埋率的影响,获得松针总黄酮微胶囊的最优工艺。

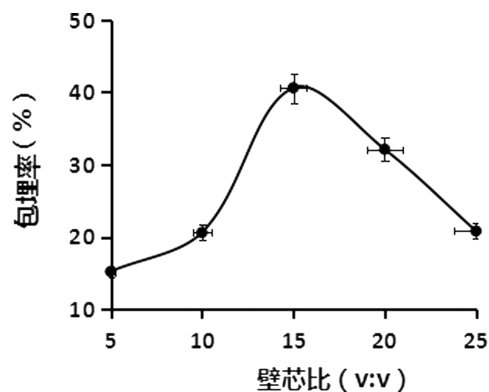


图 1 壁芯比对包埋率的影响

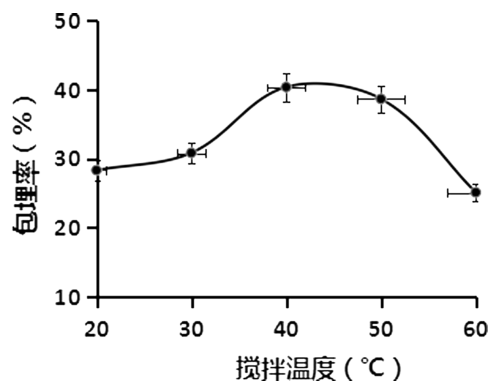


图 2 搅拌温度对包埋率的影响

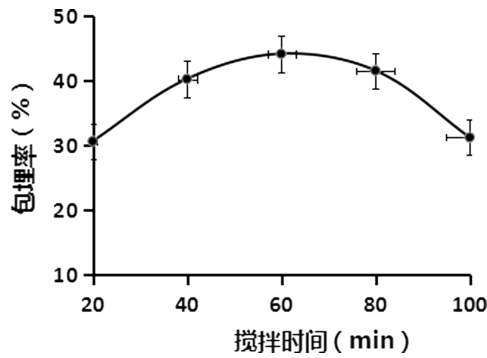


图3 搅拌时间对包埋率的影响

4.1.2 正交实验

极差越大代表此因素的影响越大,从正交实验直观分析可知各因素对包埋率的影响效果为: $A > C > B$,说明壁芯比对包埋率的影响最大。同时可见最佳因素水平组合为 A2B2C2。在壁芯比为 15,搅拌温度为 40 ℃,搅拌时间为 60 min 的条件下进行三组平行验证实验,得到包埋率分别为 51.2%、50.8%、52.1%,平均值为 51.37%,优于之前所有的实验组结果,因此确定此组合为松针总黄酮微胶囊制备的最优工艺。

表1 正交实验直观分析

试验号	因素			包埋率 (%)
	A 壁 芯比	B 搅拌 温度(℃)	C 搅拌 时间(min)	
1	10	30	40	19.6
2	10	40	60	24.9
3	10	50	80	22.5
4	15	30	60	48.7
5	15	40	80	47.3
6	15	50	40	42.1
7	20	30	80	38.3
8	20	40	40	36.1
9	20	50	60	40.5
均值 1	22.333	35.533	32.600	
均值 2	46.033	36.100	38.033	
均值 3	38.300	35.033	36.033	
极差	23.700	1.067	5.433	

表2 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 比	显著性
壁芯比	876.429	2	936.356	*	*
搅拌温度	1.709	2	1.826		
搅拌时间	45.309	2	48.407	*	
误差	0.94	2			

(注:根据正交实验助手分析,F 比大于 F0.01 标记显著性为 **,F 比大于 F0.05 标记显著性为 *。)

4.2 松针总黄酮微胶囊对 PD 防治的辅助作用

将三组验证实验的微胶囊粉末混合,放置 4 ℃ 冰箱 60 d 后,从中取两个样本分别做对分化后的 SH-SY5Y 细胞的损伤干预作用实验和羟自由基清除能力的检测。

4.2.1 MTT 法检测不同浓度的样品对分化后的 SH-SY5Y 细胞的损伤干预作用

根据图 4、图 5 所示,选择 60 mM 的 6-OHDA 作为损伤浓度,分别与不同浓度的样品 1、样品 2 (0.006 25、0.012 5、0.025、0.05、0.1、0.2 mg/mL) 共孵育 48 h,MTT 法检测细胞活性,与模型组进行比较,给药组分化后的 SH-SY5Y 细胞活力升高。

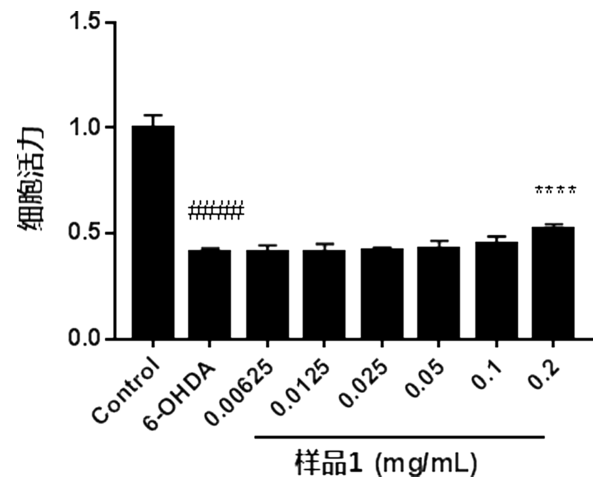


图4 样品 1,对 6-OHDA 致分化后的 SH-SY5Y 细胞损伤的干预作用

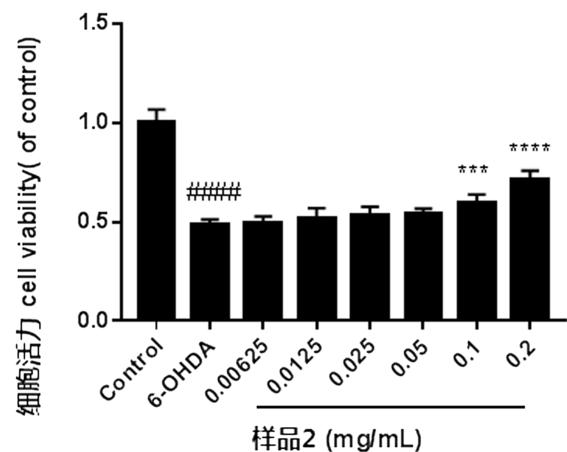


图5 样品 2,对 6-OHDA 致分化后的 SH-SY5Y 细胞损伤的干预作用

4.2.2 羟自由基清除能力的检测

根据图 6、图 7 的所示结果,样品 1、样品 2 在试验浓度范围内都表现出羟基自由基的清除作用。羟基自由基是反映药物抗氧化作用的重要指标。图 8

的结果为阳性对照品 Vc 的羟基自由基的清除作用。

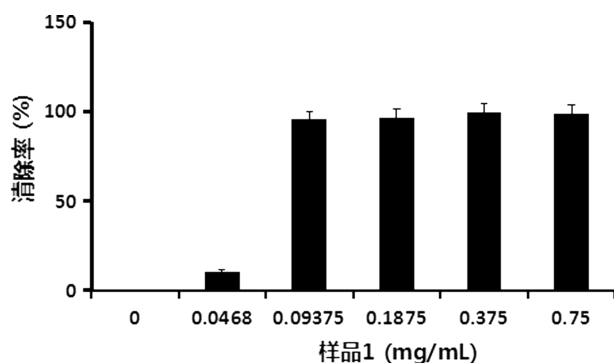


图6 样品1,对羟自由基的清除作用

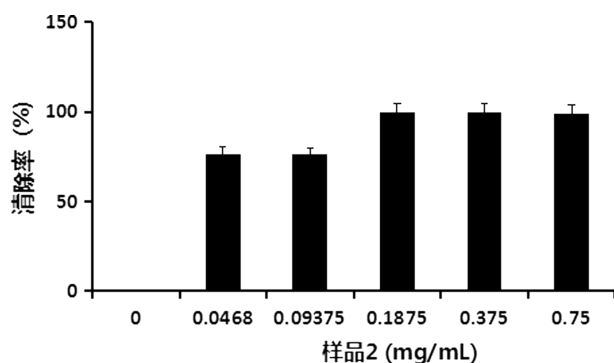


图7 样品2,对羟自由基的清除作用

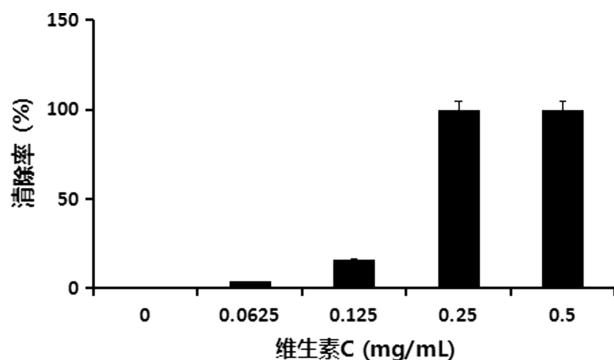


图8 阳性对照品,Vc对羟自由基的清除作用

综上所述,松针总黄酮微胶囊在放置 60 d 后,仍然表现出对 SH-SY5Y 细胞损伤有一定的保护作用,对羟自由基有较好的清除作用。因此可作为辅助改善 PD 的功能性产品而进一步研究开发。

5 总结

本实验对松针总黄酮微胶囊的制备工艺进行了优化,发现壁芯比为影响包埋率的主要因素,确定了制备松针总黄酮微胶囊的最优工艺条件为壁芯比 15,搅拌温度 40 ℃,搅拌时间 60 min。将制备出的微胶囊放置 60 d 后进行 MTT 法检测对分化后的 SH-SY5Y 细胞的损伤干预作用和检测其羟自由基清

除能力,发现其均表现出一定的效果,因此,初步认为其可作为辅助改善 PD 的功能性产品而进行研究开发,但此方面研究还有待进一步全面深入和完善。

参考文献:

- [1] ES-SAFI NE, GHIDOUCE S, DUCROT PH. Flavonoids: hemisynthesis, reactivity, characterization and free radical scavenging activity[J]. Molecules, 2007, 12(9): 2228-2258.
- [2] MATEEN S, RAINA K, AGARWAL R. Chemo-preventive and anti-cancer efficacy of silibinin against growth and progression of lung cancer [J]. Nutr Cancer, 2013, 65(Suppl 1): 3-11.
- [3] GARCIA-DIAZ JA, NAVARRETE-VZQUEZ G, GARCIA-JIMENEZ S, et al. Antidiabetic, antihyperlipidemic and anti-inflammatory effects of tilianin in streptozotocin-nicotinamide diabetic rats [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 667-675.
- [4] 王婷,徐俞悦,陈素红,等. 松针的保健功效及相关产品研究进展[J]. 中草药, 2018, 9(17): 2-3.
- [5] 曹侃,朱利. 松针黄酮类成分研究应用进展[J]. 绵阳师范学院学报, 2019, 38(05): 75-79.
- [6] FEMANDEZ H H. 2015 update on Parkinson disease [J]. Cleveland clinic journal of medicine, 2015, 82(9): 563-568.
- [7] BOIX J, PADEL T, PAUL G. A partial lesion model of Parkinson's disease in mice—characterization of a 6-OHDA-induced medial forebrain bundle lesion [J]. Behav Brain Res, 2015, 284: 196-206.
- [8] 王胜男. 甘松对 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用及机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学. 2018.
- [9] 杨秀娟,洪燕龙,阮克锋,等. 中药治疗帕金森病临床及升高脑内多巴胺含量的研究[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(2): 186-190.
- [10] 严志聪,麦杞峰. 天麻钩藤饮与多巴丝肼片联合用药治疗帕金森病的疗效观察[J]. 中国医院用药评价与分析, 2016, 16(6): 778-780.
- [11] 陈怀珍,蔡永亮,张静,等. 龟地苁星颗粒治疗左旋多巴诱发的异动症 32 例临床观察

- [J]. 中医药临床杂志, 2011, 23 (12): 1035-1036.
- [12] 秦力悦, 吴晓俊. 药用植物黄酮类化合物防治帕金森病药理学研究回顾和展望[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30 (11): 1125-1135.
- [13] 吴德智, 陈兴兵, 陈逸群, 等. 艾纳香总黄酮微胶囊制备工艺优化及稳定性研究[J]. 食品科技, 2017, 42 (10): 230-234.
- [14] 张春兰, 周洁, 王丽玲, 等. 红枣黄酮微胶囊制备条件的研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36 (23): 69-72.
- [15] 纪秀凤, 吕长鑫, 芦宇, 等. 红树莓籽黄酮微胶囊工艺优化及其体外模拟胃肠消化[J]. 食品工业科技, 2019, 40 (5): 182-187.
- [16] 战英, 陈丽娜, 石矛. 微波辅助提取红松松针总黄酮工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2015, 36 (16): 69-72.
- [17] 冉维广, 薛长晖, 姚文红. 雪松松针总黄酮醇提工艺优化[J]. 山东农业科学, 2014, 46 (9): 120-123.
- [18] 马翠霞, 赵武, 肖凤琴, 等. Box - Behnken 响应面法优化小飞蓬总黄酮纯化工艺及其抗肿瘤活性研究[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33 (9): 4104-4109.
- [19] 杨旭, 赵海洲, 徐大德, 等. 何首乌提取物对 MPP + 诱导的 SH - SY5Y 细胞损伤的保护作用[J]. 广东药学院学报, 2016, 32 (1): 71-77.
- [20] 冯小雨, 郝艳娟, 蔡瑜, 等. 黄瓜籽总黄酮体外抗氧化作用[J]. 食品研究与开发, 2018, 39 (11): 27-30.
- [21] 薛朕钰, 薛森, 王雪, 等. 添加苦荞黄酮提取物的裸燕麦挤压膨化产品抗氧化及降血脂功效研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40 (12): 33-38.
- [22] 王菲, 于苏琦, 宋力, 等. 金花葵花总黄酮的微胶囊条件优化及其对冷鲜肉保鲜作用的研究[J]. 应用化工, 2019, 48 (09): 2116-2120.