

雷钧涛,莫绍凌,姜艳霞. 托盘中多糖提取及体外对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):262-263.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.085

托盘中多糖提取及体外对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

雷钧涛¹,莫绍凌²,姜艳霞¹

(1. 吉林医药学院,吉林吉林 132013; 2. 吉林工贸学校,吉林吉林 132012)

摘要:通过正交法提取了托盘中粗多糖,探讨了水提醇沉工艺,并通过体外试验检测了托盘中多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。结果表明,托盘中水溶性多糖最佳提取工艺条件为:料水比 1:40,提取时间 2 h,提取温度 100 ℃;在此最佳工艺条件下,托盘中水溶性多糖的获得率为 4.075%。托盘中多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制呈浓度剂量依赖关系,50、75、100、200 mg/mL 的托盘中多糖的抑制率分别为 14.48%、21.72%、44.83%、50.57%,随着浓度的增大抑制作用增强。

关键词:托盘中多糖; α -葡萄糖苷酶;体外抑制;提取工艺

中图分类号:R284.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)06-0262-02

托盘中(*Rubus crataegifolius* Bge.) 为蔷薇科悬钩子属植物,别称牛叠肚,广泛分布于我国东北、华东和中南部的四川、河北、山西、陕西等地。每 100 g 果实鲜品含蛋白质 1.1 g、脂肪 0.39 g、碳水化合物 10.4 g、有机酸 0.436 g、维生素 C 32.16 mg,含钙、磷、铁等矿质元素。味酸甜,可鲜食,制果酱、果酒、果汁等^[1]。其果实可入药,具有补肝养肾、固精缩尿的功效,主治尿频、遗精、阳痿等病症。其根具有抗炎^[2]、抗衰老^[3]、抗肿瘤^[4]、祛风湿的作用,民间用其治疗风湿性关节炎、肝炎等疾病。托盘中既有食用价值,又具有良好的药用价值。本研究初步探讨了托盘中多糖的提取工艺,研究了托盘中多糖的体外降糖作用,为利用托盘中根治疗糖尿病提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

托盘中根购自吉林地区,经吉林医药学院雷钧涛教授鉴定为蔷薇科悬钩子属植物托盘中(*Rubus crataegifolius* Bunge.) 的根。阿卡波糖(美国 Sigma 公司),葡萄糖试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,批号:123001),麦芽糖、磷酸盐、无水碳酸钠、葡萄糖、3,5-二硝基水杨酸、酒石酸钾钠、酚酞、氢氧化钠、盐酸、结晶酚、偏重亚硫酸钠、乙醇等均为分析纯试剂;DK-98-II-型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司),R501 旋转蒸发仪(上海豫康科教仪器设备有限公司),SHZ-D Ⅲ型循环水真空泵(中国予华仪器厂),KQ5200E 型超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司),UV-1800 紫外可见分光光度计(日本岛津公司),DK-600 数显电热水槽(上海精宏实验设备有限公司),680 酶标仪(美国 BIORAD 公司),CPA255D 电

子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司)。

1.2 DNS 显色剂的配制^[5-6]

量取 500 mL 蒸馏水置于 1 000 mL 烧杯中,煮沸 10 min 后冷却,将称取的 3,5-二硝基水杨酸 6.3 g、氢氧化钠 21 g 充分溶解于其中。加入酒石酸钾钠 182 g、结晶酚 5 g、偏重亚硫酸钠 5 g,充分搅拌至全溶。将上述混合液倒入 1 000 mL 的棕色容量瓶中,定容,放置 10 d 备用。

1.3 方法

1.3.1 提取工艺流程 托盘中根除杂→粉碎→过筛→称量→浸泡 1 h→水提→2 000 r/min 离心 10 min→过滤→滤渣复提 3 次→离心后弃沉淀→合并滤液浓缩至原液的 1/6~1/5→乙醇醇沉→5 ℃冰柜中静置 12 h→过滤→沉淀经 3 000 r/min 离心 15 min→醇沉物加水复溶→干燥获得水溶性粗多糖。

1.3.2 多糖的测定方法

1.3.2.1 标准样品溶液的制备 称取经 105 ℃干燥至恒质量的无水葡萄糖 100.0 mg,加适量蒸馏水于称量瓶中溶解,移入 100 mL 容量瓶中(1.0 mg/mL),反复洗涤称量瓶,将洗涤液一同移入 100 mL 容量瓶,定容,摇匀,置 4 ℃冰箱中保存备用。

1.3.2.2 还原糖供试品溶液的制备 量取各变量条件下托盘中根粗多糖溶液 5.0 mL,置 25 mL 容量瓶中,定容,摇匀,过滤,弃初滤液,取续滤液,备用。

1.3.2.3 总糖供试品溶液的制备 量取各变量条件下托盘中根粗多糖溶液 5.0 mL,置于 25 mL 容量瓶中,加入 6 mol/L 盐酸 5.0 mL,置沸水浴中 40 min、冰水浴 30 min。加酚酞指示液 1 滴,用 20% 氢氧化钠溶液调至中性(微红色),定容,摇匀,过滤,弃初滤液,取续滤液,备用。

1.3.2.4 标准曲线的制备 取已配制好的浓度为 1.0 mg/mL 的葡萄糖标准品溶液,分别吸取 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL,置 25 mL 容量瓶中,分别加蒸馏水至 1.0 mL,另取 1.0 mL 蒸馏水于 25 mL 容量瓶中做空白对照。分别加入 DNS 试液 1.5 mL,混匀,沸水浴 5 min,取出,立即流水冷却,定容,摇匀。在 520 nm 处测定吸光度,以吸光度 D 为纵坐标,以浓度 C 为横坐标,绘制标准曲线,得线性回归方程: $D = 23.457C - 0.0451$,相关系数 $r = 0.9998$,说明在浓度 2.5~47.5 mg/L 范

收稿日期:2014-11-19

基金项目:吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目(编号:吉教科合字[2014]第 362 号);吉林省科技发展计划自然科学基金(编号:20140101142JC)。

作者简介:雷钧涛(1971—),男,吉林吉林人,硕士,教授,研究方向新药开发与应用。Tel:(0432) 64560527;E-mail:leijuntao123@126.com。

围内线性关系良好。

1.3.2.5 样品测定 量取总糖、还原糖供试品溶液各 1.0 mL，分别置于 25 mL 量瓶中，按照标准曲线的制备项下的方法，自“1.3.2.4”项下“加入 DNS 试液 1.5 mL”步骤起，同法测定吸光度 D 。代入线性方程，可求出样品中还原糖和总糖的浓度。

还原糖质量 = 查标准曲线所得水解前还原糖浓度 × 稀释倍数；

总糖质量 = 查标准曲线所得水解后还原糖浓度 × 稀释倍数；

总多糖含量 = (总糖质量 - 还原糖质量) / 干燥粉末质量 × 0.9 × 稀释倍数 × 100%。

1.3.3 托盘根多糖提取工艺的优化 在 3 次提取条件下，选择提取时间、料液比、提取温度、乙醇浓度 4 个因素，采用 $L_9(3^4)$ 正交设计，进行四因素三水平试验(表 1)，研究多糖提取的较佳工艺参数。

表 1 托盘根多糖提取工艺因素水平正交试验

水平	A:时间 (h)	B:料液比 (g : mL)	C:温度 (℃)	D:醇沉浓度 (%)
1	1.5	1 : 35	90	85
2	2.0	1 : 40	95	90
3	2.5	1 : 45	100	95

1.3.4 托盘根多糖体外对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

1.3.4.1 大鼠大肠黏膜糖苷酶的提取 将大鼠用 20% 的乌拉坦麻醉，固定，开腹取小肠及空肠，0.9% 生理盐水冲洗小肠内容物，用小镊子挤压采取黏膜，称质量，往该黏膜中加入 5 倍量的 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液，置于冰上匀浆。然后以 4 000 r/min 离心 20 min，取上清，分装后于 -20 ℃ 冷冻保存。

1.3.4.2 托盘根多糖对 α -葡萄糖苷酶抑制作用反应 反应体积为 1 mL，取 10 mg/mL 的酶液 0.2 mL，加 pH 值 6.8 的磷酸缓冲液 0.7 mL，分别加入 200、100、75、50 mg/mL (200 mg/mL 以上浓度的多糖基本不溶解，故放弃) 的托盘根多糖提取液 0.1 mL，同时以 0.1 mL 5 mg/mL 阿卡波糖为阳性对照，只加 0.1 mL 缓冲液作阴性对照和加等量缓冲液的空白对照，37 ℃ 水浴 10 min，加入新配的 0.5 mol/L 的麦芽糖溶液 0.1 mL，37 ℃ 水浴 20 min 后，加入 1 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液终止反应。分别观察各浓度的托盘根多糖提取液对酶的抑制作用。

按照葡萄糖试剂盒说明书操作，测定相应的葡萄糖浓度。每个样在 96 孔板上分别作 3 个平行孔，在 490 nm 处酶标仪测吸光度 D 并计算抑制率。

抑制率 = $[(D_{\text{阴性}} - D_{\text{样本}}) / (D_{\text{阴性}} - D_{\text{空白}})] \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 提取工艺正交试验结果

由表 2 可知，各因素对提取率的影响从大到小为 $C > A > B > D$ ，最佳方案为 $C_3A_2B_2D_3$ ，即在提取温度为 100 ℃、提取时间 2.0 h、料液比 1 : 40、95% 醇沉条件下提取率最大。验证试验结果显示，平均提取率为 4.075%，该组合为最优提取工艺。

2.2 托盘根多糖体外对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用试验结果

试验结果表明，随着托盘根多糖提取液浓度的增加，对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用逐渐增强，呈现出明显的浓度依赖效应关系，50、75、100、200 mg/mL 的抑制率分别为 14.48%、

表 2 托盘根多糖提取工艺正交试验方案及试验结果

试验号	列号				多糖提取率(%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.239
2	1	2	2	2	2.651
3	1	3	3	3	3.797
4	2	1	2	3	2.570
5	2	2	3	1	4.009
6	2	3	1	2	2.399
7	3	1	3	2	2.538
8	3	2	1	3	1.978
9	3	3	2	1	1.869
k_1	2.562	2.116	1.872	2.372	
k_2	2.993	2.879	2.363	2.529	
k_3	2.128	2.688	3.448	2.782	
R	0.864	0.764	1.576	0.409	

21.72%、44.83%、50.57%。阳性对照 5 mg/mL 阿卡波糖的抑制率为 94.57%。

3 结论

多糖具有多种生物活性，某些多糖不但具有抗癌、抗炎、抗病毒、抗衰老等作用，且现代研究表明大都具有调节血糖和免疫系统等功能。本试验对托盘根多糖选取 4 个因素即料液比、提取时间、提取温度、醇沉浓度，在单因素试验的基础上，采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计，对托盘水溶性粗多糖的提取工艺进行研究。结果表明，托盘根多糖提取条件的最优组合为：提取温度为 100 ℃，提取时间 2.0 h，料液比 1 : 40，95% 醇沉；在此条件下平均提取率为 4.075%。

α -葡萄糖苷酶是小肠内麦芽糖等寡糖的水解酶，主要分布在小肠上皮绒毛膜刷状缘上，可以促进麦芽糖转化为葡萄糖。 α -葡萄糖苷酶抑制剂可以通过竞争性抑制 α -葡萄糖苷酶的活性，有效地减缓葡萄糖的生成和吸收，达到抑制餐后高血糖的目的^[7]。本研究发现托盘根多糖对 α -葡萄糖苷酶具有一定的抑制作用，且显示明显的浓度-效应关系，提示其可能具有类似阿卡波糖的作用机理，通过对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用而发挥降血糖作用，下一步可通过动物试验观察托盘根多糖的降糖作用，明确托盘根多糖的降糖机理。

参考文献：

[1] 陈克杰. 野生浆果——树莓及加工利用[J]. 中国果品研究, 1987 (4): 21-23.

[2] 曹颖林, 王玉坤, 金和筠, 等. 托盘根醇提物的抗炎作用[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(11): 47-48, 65.

[3] 王爱民, 王玉坤, 刘明生, 等. 托盘根乙酸乙酯萃取物对组织脂质过氧化作用的影响[J]. 中草药, 1995, 26(7): 358-359, 392.

[4] 王玉坤, 王爱民, 曹颖林, 等. 托盘根抗衰老作用的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 1995, 15(6): 363-365, 384.

[5] 张秀宏, 张重军, 雷钧涛. DNS 法测定益肾康胶囊中多糖的含量[J]. 中国科技信息, 2012(23): 112.

[6] 田芳年, 马连荣, 莫肖云, 等. DNS 法测定红枣总糖含量[J]. 化工技术与开发, 2009, 38(9): 45-46, 55.

[7] 林玉桓, 王翔林, 王 颖, 等. 34 种中药对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用[J]. 大连轻工业学院学报, 2004, 23(4): 270-272.