

响应面法优化枸杞叶粗多糖提取纯化工艺及其降血糖活性

江磊^{1,2}, 梅丽娟¹, 刘增根^{1,2}, 李洁琼¹, 王启兰¹, 邵赟¹, 陶燕铎^{1,*}

(1.中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008; 2.中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 采用响应面法对枸杞叶粗多糖提取中的料液比、提取温度和提取时间进行优化, 确定各因素最佳的水平组合。结果显示, 在料液比1:47.2, 提取温度72.9℃、提取时间2.2h条件下, 枸杞叶粗多糖提取物中多糖的含量最高, 为(7.24±0.41)%。采用D101大孔树脂和DEAE-52阴离子交换柱对枸杞叶粗多糖进行纯化, 纯化后的精多糖中多糖含量为92.5%。用 α -D-吡喃葡萄糖苷(*p*-NPG)法对枸杞叶精多糖的 α -糖苷酶抑制活性进行了测定, 1mg/mL枸杞叶精多糖对5U/mL的糖苷酶抑制率达到93.7%, 而阳性对照药阿卡波糖抑制率仅为21.7%。

关键词: 枸杞叶; 提取工艺; 多糖

Extraction and Hypoglycemic Effect of Crude Polysaccharides from Chinese Wolfberry (*Lycium chinense*) Leaves

JIANG Lei^{1,2}, MEI Li-juan¹, LIU Zeng-gen^{1,2}, LI Jie-qiong¹, WANG Qi-lan¹, SHAO Yun¹, TAO Yan-duo^{1,*}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;

2. University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Response surface methodology (RSM) was applied to optimize process parameters for the extraction of crude polysaccharides from Chinese wolfberry (*Lycium chinense*) leaves such as solid-to-solvent ratio, temperature and time. The maximum polysaccharide content of crude extracts was (7.24 ± 0.41)% under the optimized conditions of 72.9 °C, 2.2 h and a solid-to-solvent ratio of 1:47.2, and was increased to 92.5% after purification with D101 macroporous resin and DEAE-52 anion exchange resin column chromatography. The inhibition rate of 1 mg/mL purified polysaccharides from Chinese wolfberry leaves against 5 U/mL α -glycosidase, as determined by *p*-NPG method, was 93.7% compared to only 21.7% for acarbose as a positive control.

Key words: *Lycium chinense* leaves; extraction method; polysaccharides

中图分类号: Q946.83

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)04-0042-05

糖尿病是一种临床表现为高血糖的系统性疾病, 它的直接引发原因是胰岛素分泌不足, 这种病会引起体内糖类、蛋白质和脂类代谢紊乱^[1]。在糖尿病患者中, 90%的病人都属于II型糖尿病。患这种糖尿病的病人群体数量有扩张趋势, 这种病给家庭和社会带来了沉重的经济负担^[2]。持续性高血糖可以引起体内非酶反应的蛋白糖基化, 从而在临床上表现为糖尿病的复杂病理特征^[3]。控制餐后血糖就变成了治疗糖尿病过程中的一个重点^[4]。在哺乳动物体内, 淀粉的消化主要在小肠内, 首先由 α -淀粉酶将长链淀粉分子消化为直链或支链的低聚麦芽糖, 然后由 α -糖苷酶将这些低聚糖消化为葡萄糖^[5]。因而抑制 α -糖苷酶活性就成了控制餐后血糖的关键^[6]。

枸杞叶俗称天精草, 《本草纲目》中称枸杞叶“有除烦益志补五劳七伤、壮心气、除热毒、散疮肿、除风明目”之功效。据研究, 枸杞叶的活性成分与枸杞果实基本一致, 而且在某些营养元素上甚至超过枸杞果实^[7]。据报道枸杞多糖具有减轻II型糖尿病小鼠胰岛素抵抗^[8], 诱导树突状细胞成熟和增强T细胞增殖^[9], 增强人外周血巨噬细胞的免疫功能^[10], 治疗胃溃疡^[11], 保护血管内皮细胞^[12]和抑制人食管癌细胞Eca-109的生长增殖^[13]等生理功效。枸杞叶多糖可能和枸杞多糖一样具有这些功效。为了研究枸杞叶多糖的药用价值, 其提取纯化方法变得至关重要。本实验采用响应面法对枸杞粗多糖的提取工艺进行优化, 利用大孔树脂和DEAE弱阴离子交换柱对枸杞

收稿日期: 2011-12-08

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2007BAI45B00)

作者简介: 江磊(1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为天然药物化学。E-mail: chrisjiang27@gmail.com

*通信作者: 陶燕铎(1963—), 男, 研究员, 研究方向为天然药物化学。E-mail: taoyanduo@163.com

叶粗多糖进行了纯化,用 α -D-吡喃葡萄糖苷(p-NPG)的方法测定了枸杞叶精多糖对 α -糖苷酶的抑制活性,从而估计枸杞叶精多糖的降血糖活性。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

取25℃条件下阴干的枸杞叶,于60~80℃烘干2h,经粉碎、干燥至质量恒定后备用。

p-NPG、 α -糖苷酶(E.C.3.2.1.20) 美国Sigma公司。DEAE-52阴离子交换柱柱料 美国Amresco公司; D101大孔树脂 天津南大树树脂科技有限公司。苯酚、浓硫酸等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-1800型紫外-可见光分光光度计 日本岛津公司; HH-6恒温水浴锅 郑州杜甫仪器厂; AE240S型电子分析天平 德国梅特勒-托利多公司; Model 680酶标仪 美国Bio-Rad公司。

1.3 多糖含量的测定

准确称取100mg葡萄糖,以去离子水溶解并定容至100mL,精确量取葡萄糖标准工作液(1mg/mL)0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL,分别置于试管中,各加去离子水使成2mL,各管中葡萄糖的质量浓度分别为0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50mg/mL。吸取上述各管中的葡萄糖溶液0.6mL至于干净试管中,加6%苯酚试剂1.2mL摇匀。迅速滴加浓硫酸6.0mL,并迅速摇匀。静置5min,沸水浴15min取出。流动水冷却至室温。另以0.6mL去离子水同样操作,作空白对照,在490nm波长处测定吸光度。以葡萄糖质量浓度C为横坐标、吸光度A为纵坐标,制作标准曲线并得其回归方程为 $A=9.75C-1.09(R^2=0.9995)$ 。

多糖含量的测定参考方崇波等^[14]的方法稍作修改。精密称取一定质量的枸杞叶粗多糖样品,测定吸光度后计算葡萄糖质量浓度后,按照下式计算枸杞叶粗多糖样品中多糖的含量:

$$\text{多糖含量}/\% = \frac{C_1 \times V}{m \times D} \times 100$$

式中: C_1 为葡萄糖的质量浓度; V 是样品溶液总体积; m 为样品总质量; D 为样品稀释倍数。

1.4 基本提取工艺流程

枸杞叶粗多糖制备的基本工艺流程: 阴干的枸杞叶经粉碎后过100目筛→热水浸渍提取→离心取上清液(4000r/min, 10min)→乙醇沉淀→离心取沉淀(4000r/min, 10min)→乙醇洗涤→干燥溶剂→枸杞叶粗多糖。

1.5 单因素试验

设定温度70℃、浸提时间2h、料液比(枸杞叶粗粉与水质量比)1:50,固定其他条件分别考察料液比(1:30、

1:40、1:50、1:60)、浸提温度(60、70、80、90℃)、浸提时间(1、2、3、4h)对枸杞叶粗多糖得率的影响。

1.6 响应面法对工艺进行优化

利用响应面法,对水解条件进行优化。以多糖含量作为响应值,试验因素及水平见表1。

表1 水解工艺的试验因素编码表

Table 1 Independent variables and their coded levels used in response surface analysis

变量	编码水平		
	-1	0	1
X_1 料液比	1:30	1:40	1:50
X_2 温度/℃	60	70	80
X_3 时间/h	1	2	3

1.7 枸杞叶粗多糖的纯化

首先将枸杞叶阴干粉碎,于90℃纯水中浸渍5h,离心取上清液并加入无水乙醇使最终醇体积分数达到85%后于常温沉淀2h。将沉淀用无水乙醇洗涤2次,干燥后得到枸杞叶粗多糖。最后将枸杞叶粗多糖于4℃保存待用。

将上述干燥的枸杞叶粗多糖小心溶于去离子水中,并将此多糖溶液通过已处理的D101大孔树脂柱,流速10mL/min。再用去离子水以相同的流速用3倍柱体积的流量进行洗柱。小极性杂质均吸附在大孔树脂上,去离子水洗脱下的组分即为第一步纯化后的枸杞叶多糖溶液。将此多糖溶液冷冻干燥后于4℃保存待用。

将第1步纯化中多糖冻干粉用去离子水溶解,溶解时应注意要尽可能的增加溶液的浓度。将多糖溶液通过已用去离子水平衡的DEAE-52柱分离,流速0.15mL/min。在进行洗脱时流速为1mL/min,首先用3倍柱体积的去离子水洗柱,除去不能吸附的杂质,然后用1.0mol/L的NaCl溶液进行洗脱。将洗脱液透析除盐后冷冻干燥即为纯化后的枸杞叶精多糖(PO),于4℃保存待用。

1.8 PO的 α -糖苷酶抑制活性测定

1.8.1 样品溶液的制备

首先配制2mg/mL的PO溶液,用去离子水稀释成0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1mg/mL。阳性对照药阿卡波糖配成1.0mg/mL。

1.8.2 α -糖苷酶抑制活力的测定

参考康文艺等^[15]的方法稍作修改。将5U的 α -糖苷酶溶于50mmol/L的pH7.4的磷酸缓冲液中定容至1mL制成酶液。将待测样品精确称取10mg定溶于1mL相同的磷酸缓冲液中制成样品溶液。取1mL相同的磷酸缓冲液用作空白对照。首先在96孔板中加入酶液20 μ L和样品液40 μ L,37℃水浴10min。然后用排枪快速加入60 μ L的20mmol/L的P-NPG溶液,37℃水浴10min。反应结束后,立即用排枪快速加入0.2mol/L Na_2CO_3 (160 μ L/孔)。将96孔板置于酶标仪上用405nm波长进行检测, α -糖苷酶活性抑制率计算公式如下:

$$I/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

式中： A_0 为空白的吸光度； A_1 为样品吸光度。

1.9 统计与分析

本实验采用SAS 9.1软件对实验结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 料液比对多糖含量的影响

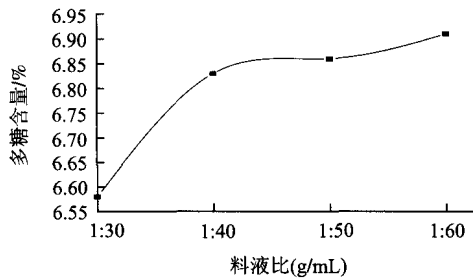


图1 料液比对枸杞叶多糖含量的影响

Fig.1 Effect of solid-to-solvent ratio on polysaccharides content of crude extracts

由图1可知，料液比在1:30~1:40范围内，枸杞叶粗多糖含量迅速上升，从6.57%上升到6.82%，增加了2.50%。但是在1:40~1:60范围内，枸杞叶粗多糖含量上升缓慢，增加了0.09%。从实际生产成本综合考虑，选取1:30、1:40和1:50三个水平进行响应面试验。

2.1.2 提取温度对多糖含量的影响

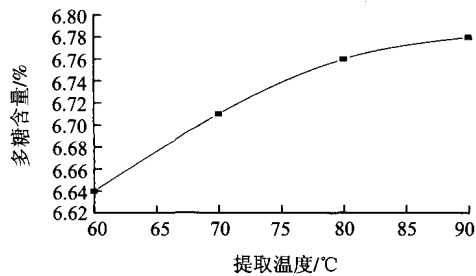


图2 提取温度对多糖含量的影响

Fig.2 Effect of temperature on polysaccharides content of crude extracts

提取温度为60°C时，多糖含量为6.64%；提取温度为80°C时，多糖含量迅速上升到6.71%；当提取温度从80°C上升到90°C时，多糖含量增加缓慢，提高了0.08%，因此选择提取温度水平60、70°C和80°C进行响应面试验。

2.1.3 提取时间对多糖含量的影响

提取时间为1h时，多糖含量较低，为6.47%；当浸提时间为2h时，多糖含量有较大幅度的提高，为6.63%。提取时间为3h和4h时，多糖含量分别为6.85%和6.91%。但

3h后上升缓慢，因此选择1、2h和3h进行响应面试验。

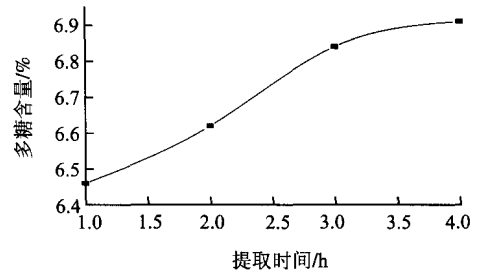


图3 提取时间对粗多糖含量的影响

Fig.3 Effect of time on polysaccharides content of crude extracts

2.2 响应面试验

表2 响应面设计及响应值

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

序列号	X_1 料液比	X_2 温度	X_3 时间	Y 多糖含量/%
1	-1	-1	0	7.162
2	-1	1	0	6.995
3	1	-1	0	6.938
4	1	1	0	7.225
5	0	-1	-1	7.138
6	0	-1	1	6.905
7	0	1	-1	6.996
8	0	1	1	7.249
9	-1	0	-1	7.181
10	1	0	-1	6.965
11	-1	0	1	6.903
12	1	0	1	7.221
13	0	0	0	7.352
14	0	0	0	7.353
15	0	0	0	7.355

应用SAS 9.1统计软件对响应面试验结果(表2)进行多元二次回归分析，将极不显著的项(X_3)剔除之后，可以得到回归方程：

$$Y = 7.35 + 0.0135X_1 + 0.0403X_2 - 0.1396X_1^2 - 0.1351X_2^2 - 0.1476X_3^2 + 0.135X_1X_2 + 0.1335X_1X_3 + 0.1215X_2X_3$$

表3 回归分析表

Table 3 Analysis of variance for the fitted regression model

变量	自由度	参数估计	标准差	t值	P
截距	1	7.35467	0.01224	601.09	<0.0001
X_1	1	0.0135	0.00749	1.8	0.1315
X_2	1	0.04025	0.00749	5.37	0.003
X_3	1	-0.0003	0.00749	-0.03	0.9747
X_1^2	1	-0.1396	0.01103	-12.66	<0.0001
X_2^2	1	-0.1351	0.01103	-12.25	<0.0001
X_3^2	1	-0.1476	0.01103	-13.38	<0.0001
X_1X_3	1	0.1135	0.0106	10.71	0.0001
X_1X_2	1	0.1335	0.0106	12.6	<0.0001
X_2X_3	1	0.1215	0.0106	11.47	<0.0001
残差标准差		0.21193	R^2		0.9942
因变量均值		7.2947	R^2_{Adj}		0.9838
CV/%		2.9054			

如表3所示,对回归方程的各因子和总体进行方差分析,结果表明各应变变量与全体自变量多元回归关系显著,因此可以用回归值代替真实值对实验进行研究。

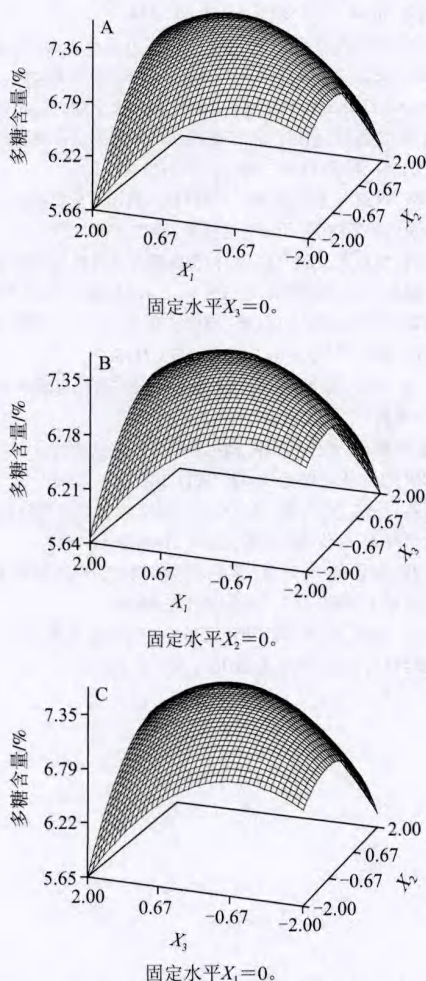


图4 各因素交互作用对多糖含量的响应面图

Fig.4 Response surface plots for the effect of extraction parameters on polysaccharides content of crude extracts

如图4A所示,在一定范围内,多糖含量随料液比和提取温度的升高而升高,显出极显著的交互作用关系,图4B和4C同样可以观察到。随着温度的升高,多糖分子内能增加,分子运动加剧,溶解性增强;而温度过高会破坏多糖分子,促进杂质溶入,造成最后样品中多糖含量偏低。因此温度只能控制在一个合适的范围内。如果料液比太大,溶剂溶解多糖的能力有限,会造成多糖含量低;而料液比太小又会使许多杂质成分溶入提取液中,也会造成多糖含量低。因此料液比也只能控制在一个合适的范围内。提取时间过长,会促进杂质成分的溶入,而提取时间太短会降低多糖分子溶解量,因此提取时间也只能控制在一个合适的范围内。

根据图4观察最佳水解条件近似为:料液比1:50、温

度70℃、时间2h。为了得到准确的工艺条件,将多元二次方程两边分别对 X_1 、 X_2 、 X_3 做一阶偏微分,对方程组的一阶偏导取值为零,得到方程组:

$$\begin{cases} 0.0135 - 0.2792X_1 + 0.134X_2 + 0.113X_3 = 0 \\ 0.0403 + 0.135X_1 - 0.2702X_2 + 0.122X_3 = 0 \\ 0.1335X_1 + 0.1215X_2 - 0.2952X_3 = 0 \end{cases}$$

解得最优条件为 $X_1=0.1458$ 、 $X_2=0.1298$ 、 $X_3=0.1194$,即:料液比1:47.2、温度72.9℃、时间2.2h。

2.3 对最优提取工艺的验证实验

利用2.2节中得到的最佳提取工艺参数,料液比1:47.2、温度72.9℃、时间2.2h,平行进行5次实际提取实验,得到的多糖含量为(7.24±0.41)%,与模型值7.36%相近,再次验证了回归模型的正确性。

2.4 α-糖苷酶抑制活性的测定

经苯酚硫酸法检验,纯化后多糖含量为92.5%(后文中的枸杞叶多糖指的是提纯后的枸杞叶多糖)。将纯化后的多糖用于α-糖苷酶活性的检测,结果如图5所示,枸杞叶多糖在质量浓度范围0.3~0.7mg/mL范围内对α-糖苷酶的抑制活力表现出强烈的质量浓度依赖性,在质量浓度大于0.8mg/mL时进入平台期,抑制活力随抑制剂质量浓度增大变化不大。这表明PO具有抑制糖吸收的功能,具有降糖的功效。由表4可知,在相同质量浓度1mg/mL下,枸杞叶多糖的抑制率达93.7%,而阿卡波糖(Acarbose)仅为21.7%。枸杞叶多糖对α-糖苷酶半数抑制率 $IC_{50}=0.51$ mg/mL。

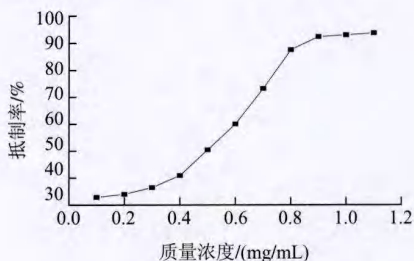


图5 PO的抑制率随质量浓度变化的关系

Fig.5 Relationship of α-glycosidase inhibitory activity and concentration of purified polysaccharides

表4 空白、阳性药物、PO对α-糖苷酶的抑制率比较
Table 4 Comparison of α-glycosidase inhibitory activity of acarbose and purified polysaccharides

实验组	剂量/(mg/mL)	α-糖苷酶抑制率/%
对照	—	0.89±0.17
阿卡波糖(Acarbose)	1	21.7±2.65
枸杞叶多糖	1	93.7±1.67

注:对以上各组用Kruskal-Wallis Test进行统计分析并打分得到 $\chi^2=10.42$, $P=0.0153$,说明各组之间差异均显著。

3 结论

采用热水浸提法提取枸杞叶粗多糖,其工艺参数用响应面法进行优化,得到的回归方程的 $R^2=0.9942$,说明拟合方程可以很好地描述实际值。优化的工艺参数结果为:料液比1:47.2、温度72.9℃、时间2.2h,此条件下多糖含量为 $(7.24 \pm 0.41)\%$,工艺验证实验表明最大工艺条件可靠。采用大孔树脂和DEAE阴离子交换树脂对枸杞叶多糖进行纯化,纯化后含量升至92.5%。用纯化后的多糖进行 α -糖苷酶抑制剂活性检测,结果表明枸杞叶精多糖是一种很好的 α -糖苷酶抑制剂,其 $IC_{50}=0.51\text{mg/mL}$ 。

参考文献:

- [1] STEPHENS J, BOTTEMAN M, HAY J. Economic impact of antidiabetic medications and glycemic control on managed care organizations: a review of the literature[J]. *Journal of Managed Care Pharmacy*, 2006, 12(2): 130-142.
- [2] YACH D, STUCKLER D, BROWNELL K. Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes[J]. *Nature Medicine*, 2006, 12(2): 62-66.
- [3] LEBOIVTZ H E. Postprandial hyperglycemic state: importance and consequences[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 1998, 40(Suppl1): S27-S28.
- [4] BARON A. Postprandial hyperglycemia and *alpha*-glucosidase inhibitors[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 1998, 40(Suppl1): 51-55.
- [5] CASIROLA D M, FERRARIS R P. *Alpha*-glucosidase inhibitors prevent diet induced increases in intestinal sugar transport in diabetic mice[J]. *Metabolism*, 2006, 55(6): 832-841.
- [6] NAKAMURA K, YAMAGISHI S, MATSUI T, et al. Acarbose, an *alpha*-glucosidase inhibitor, improves insulin resistance in fructose-fed rats[J]. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 2005, 31(4): 155-159.
- [7] 贺晓惠, 贾孟辉, 俞维, 等. 宁夏枸杞叶基础研究述要及应用开发的前景[J]. *时珍国医国药*, 2007, 5(1): 1111-1112.
- [8] 宗灿华, 田丽梅. 枸杞多糖对2型糖尿病胰岛素抵抗模型大鼠 *resistin* 基因表达的影响[J]. *药物生物技术*, 2008, 15(4): 275-277.
- [9] 张纯清, 单铁英, 杨书良, 等. 枸杞多糖对诱导树突状细胞成熟和增强 T 细胞增殖的影响[J]. *重庆医学*, 2010, 39(16): 2117-2118.
- [10] 许忠新, 单铁英, 苏安英, 等. 枸杞多糖对大鼠外周血巨噬细胞活性的影响[J]. *重庆医学*, 2010, 39(16): 2177-2178.
- [11] 张一芳, 冯怡, 徐德生. 枸杞多糖对大鼠实验性胃溃疡的作用研究[J]. *中国药业*, 2011, 20(1): 14-15.
- [12] 李鹏, 尹雅玲, 卢光洲, 等. 枸杞多糖抑制对硫磷致血管内皮功能损伤的研究[J]. *天津医药*, 2011, 39(1): 56-58.
- [13] 单铁英, 孙健, 王芳, 等. 枸杞多糖诱导人食管癌细胞 Eca-109 凋亡的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(7): 1642-1643.
- [14] 方崇波, 赵夏雨, 吴巧凤. 苯酚硫酸法测定猕猴桃多糖注射剂中多糖的含量[J]. *海峡药学*, 2010, 22(10): 64-66.
- [15] 康文艺, 张丽, 陈林, 等. 两种唇形科植物荔枝草和夏至草 α -糖苷酶抑制活性研究[J]. *中成药*, 2010, 32(3): 493-495.