

甘草中 α -葡萄糖苷酶抑制物的提取工艺研究

曾岚, 吴晖, 袁坤, 赖富饶, 李晓凤

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文研究了甘草中 α -葡萄糖苷酶抑制物质的提取工艺。采用单因素实验和正交实验确定了各因素对提取工艺的影响和最佳工艺条件, 其最佳提取工艺为: 提取温度为30℃、提取时间为1 h、提取试剂为水, 料液比为1:10, 此时, α -葡萄糖苷酶抑制率达到48.94%。提取条件影响工艺的主次顺序依次为: 提取时间、提取温度、料液比、提取试剂。

关键词: 甘草; α -葡萄糖苷酶抑制物质; 提取工艺

文章编号: 1673-9078(2012)5-524-526

Extraction of α -glucosidase Inhibitor from *Glycyrrhizins uralensis* Fisch

ZENG Lan, WU Hui, YUAN Kun, LAI Fu-rao, Li Xiao-feng

(College of light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, GuangZhou 510640, China)

Abstract: The extraction process of α -glucosidase inhibitor from *Glycyrrhizins uralensis* Fisch were investigated in this article. With single factor experiment and the orthogonal experiment designed, the best extracting reagent was determined as water and the best extraction process were confirmed as follows: extraction temperature 30℃, extraction time 1 hour and ratio of solid to liquid 1:10, under which 48.94% of α -glucosidase inhibitor was obtained. The effects of the extraction parameters on α -glucosidase yield were in order of extracting time >temperature>ratio of solid to liquid.

Key words: glycyrrhizins uralensis fisch; α -glucosidase inhibitor; extracting process

α -葡萄糖苷酶抑制剂在糖尿病治疗中具有重要作用, 其作用机制为抑制小肠壁 α -葡萄糖苷酶的活性, 从而明显延缓阻碍碳水化合物的吸收速度, 延迟葡萄糖的吸收, 有效推迟并减轻糖尿病人餐后血糖升高的时间及进程。其来源包括人工合成和天然提取物两种, 其中人工合成的酶抑制剂具有强烈的抑制作用, 通常会引起肝脏疾病和其他消极胃肠道症状的副作用。比较而言, 从自然界中提取的 α -葡萄糖苷酶抑制物质相对温和安全, 因此引起了广泛重视^[1]。目前自然环境中 α -葡萄糖苷酶抑制物质的来源有微生物、动物, 还有植物^[2], 其中植物来源较为广泛, 例如虎杖^[3]、桑叶^[4]、五味子^[5]、绿茶^[6]、龙眼核^[7]等很多植物均含 α -葡萄糖苷酶抑制物质。甘草为豆科多年生草本植物, 以根和根茎入药, 是重要的的常见中草药。有文献报道, 甘草中也能提取到 α -葡萄糖苷酶抑制物质, 并对其酶抑制动力学进行了研究, 但并未对提取工艺进行优化^[8-9]。基于上述研究现状, 本实验对甘草中 α -葡萄糖苷酶抑制物质的提取条件进行了研究, 探讨了不同处理方法对甘草提取物的酶活性抑制率的影响, 确定了甘草中 α -葡萄糖苷酶抑制物质的最佳提取条件。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

PHS225数显pH计(上海精密科学仪器有限公司); UV-1700紫外分光光度计; 树脂AB-8、NKA-9, 购于南开大学树脂厂; 树脂HPD-400、HPD-722、HPD-750, 购于沧州宝恩吸附材料科技有限公司; 树脂AL-1、AL-2、OU-2, 购于天津欧瑞生物科技有限公司; α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase, EC31211120, Type I: From Bakers Yeast), 4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(4-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, PNPG, EC223218923)均购自Sigma; 药材购自广州市中药材市场, 经鉴定为豆科植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch), 其余试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 α -葡萄糖苷酶抑制物质提取方法

将甘草粉碎, 称取粉末 20 g, 加入 200 mL 水中, 放入 25℃恒温水浴摇床中振荡 12 h, 离心得上清液, 用水定容至 200 mL, 加入 200 mL 乙酸乙酯, 并放入恒温水浴摇床中振荡 1 h, 用分液漏斗静置分层得乙酸乙酯层, 用旋转蒸发器蒸发掉乙酸乙酯, 剩余物质用水溶洗并定容至 250 mL, 即得甘草水提液^[10]。

1.2.2 酶活性检测方法

收稿日期: 2011-11-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471225)

α -葡萄糖苷酶抑制物质活性测定^[11]: 以PNPG为底物, 在2 mL 0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液(pH 6.8)中, 加待测甘草提取液2 mL与PNPG(终浓度为2 mmol/L), 然后加 α -葡萄糖苷酶0.05 U, 37 °C反应15 min后, 加入0.1 mol/L Na₂CO₃溶液4 mL终止反应, 在波长400 nm处测定吸收值。

$$\text{酶活性抑制率/\%} = \frac{A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{背景}})}{A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

1.2.3 试验设计

经过预试验确定影响提取含量的主要因素为提取试剂、时间、温度、料液比。因此先进行单因素试验, 根据单因素试验的结果, 选取三项对提取条件产生较大影响的因素进行L₉(3³)正交试验, 根据正交试验结果确定最佳工艺。

2 结果与分析

2.1 提取试剂对提取含量的影响

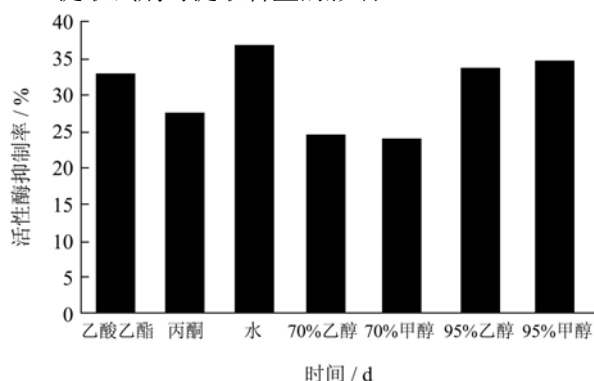


图1 提取试剂对甘草中 α -葡萄糖苷酶抑制物质提取的影响
Fig.1 Effects of extraction solvent on extraction efficiency of α -glucosidase inhibitor from *Glycyrrhizins uralensis* Fisch

由图1可知, 在实验所选择的七种提取试剂当中, 其它因素不变的前提下, 70%的乙醇和70%的甲醇对其提取效果最差, 酶活抑制率均低于25%。其中水对 α -葡萄糖苷酶抑制物质的提取率效果最好, 酶活抑制率达到35.29%。这可能与提取物质的极性大小和结构有关。故在设计正交试验时, 选取水作为提取试剂, 做进一步研究。

2.2 温度对提取含量的影响

由图2可知, 当温度低于30 °C时, 随着温度的升高, 从热动力学方面增加了 α -葡萄糖苷酶抑制物质的溶出, 从而提取含量呈上升趋势; 当温度高于30 °C时, 可能 α -葡萄糖苷酶抑制物质发生水解、裂解或者之间发生了一系列反应, 从而使提取含量呈下降趋势。因而最佳提取温度应在30 °C左右。

2.3 时间对提取含量的影响

由图3可知随着时间的增长不利于 α -葡萄糖苷酶

抑制物质的溶出, 从而提取含量呈下降趋势; 说明甘草中的 α -葡萄糖苷酶抑制物质在短时间内就基本从甘草内溶出, 时间的加长只是增加了 α -葡萄糖苷酶抑制物质的水解、裂解等各种损耗反应, 同时, 时间的加长会使水和各种有机溶剂挥发的更多, 从而降低提取率。因而在设计正交试验时, 提取时间选取1 h。

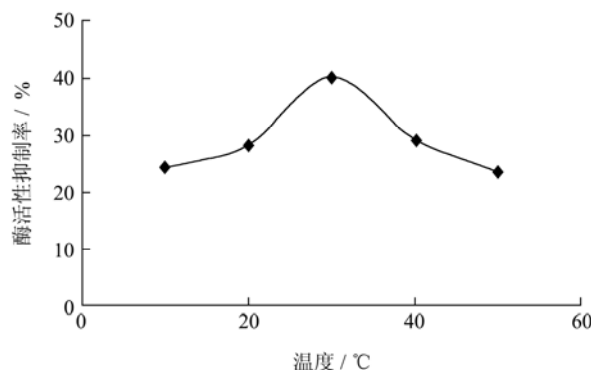


图2 温度对甘草中 α -葡萄糖苷酶抑制物质提取的影响
Fig.2 Effects of temperature on extraction efficiency of α -glucosidase inhibitor from *Glycyrrhizins uralensis* Fisch

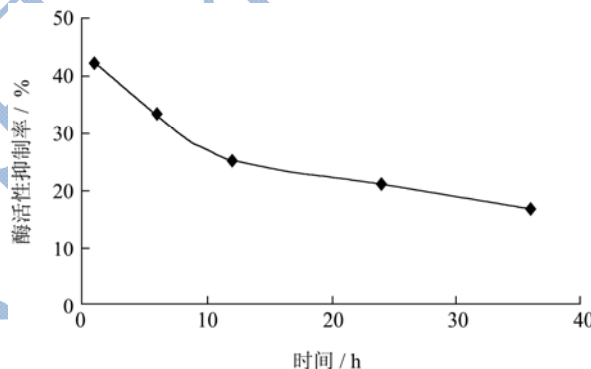


图3 时间对甘草中 α -葡萄糖苷酶抑制物质提取的影响
Fig.3 Effects of time on extraction efficiency of α -glucosidase inhibitor from *Glycyrrhizins uralensis* Fisch

2.4 料液比对提取含量的影响

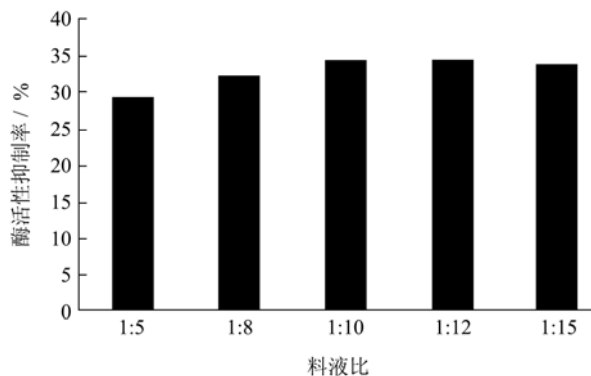


图4 物料比对甘草中 α -葡萄糖苷酶抑制物质提取的影响
Fig.4 Effects of solid-liquid ratio on extraction efficiency of α -glucosidase inhibitor from *Glycyrrhizins uralensis* Fisch

由图4可知随着料液比的增加并达到1:10时, 甘草中 α -葡萄糖苷酶抑制物质的溶出呈上升趋势, 当料

液比超过 1:10 时, 溶出反而有所降低, 说明对于等量的甘草来说, 水的增多有利于提高目标物质的提取效率, 但超过一个界限时, 可能造成 α -葡萄糖苷酶抑制物质发生水解等反应, 降低其提取效率。因此, 在实验中, 我们选取料液比的比值在 1:10 左右。

2.5 正交试验后各甘草提取液的酶活性抑制率

根据单因素试验结果提取时间, 料液比和提取温度对提取含量的影响较大, 采用 $L_9(3^3)$ 正交表设计提取了各类甘草液^[13-14]。因素表如表1。并通过对实验数据进行直观分析和方差分析来确定 α -葡萄糖苷酶抑制物质的最佳提取条件, 实验结果见表2, 方差分析见表3。

表1 正交实验因素和水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	A(温度/°C)	B(时间/h)	C(料液比)
1	20	1	1:8
2	30	2	1:10
3	40	3	1:12

表2 正交试验直观分析表

Table 2 Orthogonal array design matrix and experimental results

序号	A	B	C	酶活性抑制率/%
1	1	1	1	43.61
2	1	2	2	35.97
3	1	3	3	23.54
4	2	1	2	48.13
5	2	2	3	39.16
6	2	3	1	28.63
7	3	1	3	45.35
8	3	2	1	37.63
9	3	3	2	25.75
k_1	34.37	45.70	36.62	
k_2	38.64	37.59	36.61	
k_3	36.24	25.97	36.02	
R	4.27	19.73	0.60	

表3 方差分析表

Table 3 Variance analysis table

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值(F_{α})
A	27.455	2	0.133	5.140
B	589.651	2	2.863	5.140
C	0.728	2	0.004	5.140
误差	617.82	6		

由表2可知提取效果温度因素中, $K_2 > K_3 > K_1$, 即 $30\text{ }^\circ\text{C} > 40\text{ }^\circ\text{C} > 20\text{ }^\circ\text{C}$; 时间因素中, 提取效果为 $K_1 > K_2 > K_3$, 即 $1\text{ h} > 2\text{ h} > 3\text{ h}$; 料液比中, 提取效果

$K_2 > K_3 > K_1$, 即 $1:10 > 1:12 > 1:8$; 所以最佳实验条件为 $A_2B_1C_2$, 即甘草与水以质量体积比 1:10 在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 下振荡提取 1 h 的提取效果最好。由表3可知, $F(B) > F(A) > F(C)$, 即时间的不同对提取效果的影响最大, 温度次之, 料液比对提取效果的影响最小。

3 结论

3.1 实验结果表明, 各因素对 α -葡萄糖苷酶抑制物质提取率的影响顺序为: 提取时间 > 温度 > 料液比 > 提取试剂。提取 α -葡萄糖苷酶抑制物质的最佳工艺条件: 提取温度为 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、提取时间为 1 h、料液比为 1:10, 提取试剂为水。

3.2 该实验研究了影响甘草中 α -葡萄糖苷酶抑制物质提取率的几个主要因素, 但其余因素对 α -葡萄糖苷酶抑制物质提取率是否具有影响还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 张文婷, 方青枝. α -葡萄糖苷酶抑制剂物质的研究进展[J]. 福建医药杂志, 2009, 31(2): 85-87
- [2] 张文婷, 方青枝. α -葡萄糖苷酶抑制剂物质的研究进展[J]. 福建医药杂志, 2009, 31(2): 85-87
- [3] 沈忠明, 李英, 姜宏, 等. 降糖中药对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2000, 21(2): 69-70
- [4] 胡竟一, 雷玲, 邓文龙. 桑叶的 α -葡萄糖苷酶抑制作用研究[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(6): 44-45
- [5] 徐林峰, 沈忠明, 殷建伟, 等. 五味子中提取 α -葡萄糖苷酶抑制剂的的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2001, 22(3): 127-129
- [6] 尹学哲, 全吉淑, 安昌善, 等. 绿茶提取物对糖尿病大鼠糖耐量的影响及机制研究现代[J]. 中西医结合杂志, 2004, 13(9): 1145-1146
- [7] 黄儒强, 刘学铭, 曾庆孝. 龙眼核提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究[J]. 现代食品科技, 2005, 21(2): 62-63
- [8] 高小平. 中药提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制物质的筛选[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(6): 536
- [9] 李英. α -葡萄糖苷酶抑制物质的筛选和初步研究[J]. 上海大学学报(自然科学版), 2000, 6(2): 129
- [10] 许有瑞, 倪京满, 孟庆刚, 等. 甘草中 α -葡萄糖苷酶抑制物质的初步研究[J]. 中药材, 2005, 28(10): 890-891
- [11] Babu TH, Rao VRS, Tiwari A K, et al. Synt hesis and biological evaluation of novel aminomet hylated oroxylin A analogues as α -glucosidase inhibitors [J]. Bioorg Med Chem Lett. 2008, 18(5): 1659-1662
- [12] 曹悦, 左代英, 王维宁, 等. 龙胆药材提取工艺的正交实验设计法优选[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9): 2264-2265

- [13] 崔思颖,朱明军,李晶博,等.正交实验法优选细菌纤维素的发酵工艺研究[J].现代食品科技,2009,25(12):1452-1453
- [14] 姜峻,陈蕾俊,王晓梅.正交试验优化浙贝母多糖的提取工艺[J].现代食品科技,2011,27(7):823-825

现代食品科技